

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-502324

(P2005-502324A)

(43) 公表日 平成17年1月27日(2005.1.27)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09</b>	C 1 2 N 15/00	2 G O 4 5
<b>A 6 1 K 38/00</b>	A 6 1 K 45/00	4 B O 2 4
<b>A 6 1 K 45/00</b>	A 6 1 K 48/00	4 B O 6 3
<b>A 6 1 K 48/00</b>	A 6 1 P 15/00	4 C O 8 4
<b>A 6 1 P 15/00</b>	A 6 1 P 15/16	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 203 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-585597 (P2002-585597)	(71) 出願人	503392884
(86) (22) 出願日	平成14年4月26日 (2002. 4. 26)		ペイラー カレッジ オブ メディシン
(85) 翻訳文提出日	平成15年10月24日 (2003. 10. 24)		アメリカ合衆国、テキサス州 77030
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/013245		、ヒューストン、スイート 106エイ、
(87) 国際公開番号	W02002/088314		ワン ペイラー プラザ、アソシエイト
(87) 国際公開日	平成14年11月7日 (2002. 11. 7)		ジェネラル カウンセル (番地なし)
(31) 優先権主張番号	09/844, 864	(71) 出願人	397012945
(32) 優先日	平成13年4月27日 (2001. 4. 27)		ワイス
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国 ニュージャージー州 マ
			ジソン、ファイブ ジラルダ ファームズ
			(番地なし)
		(74) 代理人	100092266
			弁理士 鈴木 崇生
		(74) 代理人	100104422
			弁理士 梶崎 弘一
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 卵巣特異的遺伝子およびタンパク質

## (57) 【要約】

本発明は概して卵巣特異的遺伝子 (01-180、01-184および01-236) およびそれらがコードするタンパク質に関する。また、生殖組織における細胞増殖性障害または細胞変性障害を検出する方法も提供する。さらにまた本発明は、卵巣特異的遺伝子と相互作用する化合物および/または卵巣特異的遺伝子の発現または活性を調整する化合物のスクリーニング方法も提供する。これらの化合物は避妊薬および/または妊娠薬である可能性がある。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

配列番号11の核酸配列を含む単離されたポリヌクレオチド配列。

## 【請求項 2】

配列番号13の核酸配列を含む単離されたポリヌクレオチド配列。

## 【請求項 3】

薬学的に許容できる担体中に分散した01-180発現のモジュレーターを含む医薬組成物。

## 【請求項 4】

モジュレーターが01-180遺伝子の転写を抑制する請求項3の組成物。

## 【請求項 5】

モジュレーターが01-180遺伝子の転写を増進する請求項3の組成物。

## 【請求項 6】

モジュレーターがポリペプチドである請求項3の組成物。

## 【請求項 7】

モジュレーターが小分子である請求項3の組成物。

## 【請求項 8】

モジュレーターがポリヌクレオチド配列である請求項3の組成物。

## 【請求項 9】

ポリヌクレオチド配列がDNAまたはRNAである請求項9の組成物。

## 【請求項 10】

作動的に連結したプロモーターとポリヌクレオチド配列とを含む発現ベクターをさらに含む請求項9の組成物。

## 【請求項 11】

薬学的に許容できる担体中に分散した01-180活性のモジュレーターを含む医薬組成物。

## 【請求項 12】

01-180活性を阻害する請求項11の組成物。

## 【請求項 13】

01-180活性を刺激する請求項11の組成物。

## 【請求項 14】

避妊を調整する方法であって、薬理学的に許容できる担体中に分散した01-180活性のモジュレーターの有効量を動物に投与することを含み、前記の量が受胎を減少させることのできる方法。

## 【請求項 15】

動物が雌である請求項14の方法。

## 【請求項 16】

動物が雄である請求項14の方法。

## 【請求項 17】

妊性を強化する方法であって、薬理学的に許容できる担体中に分散した01-180活性のモジュレーターの有効量を動物に投与することを含み、前記の量が受胎を増加させることのできる方法。

## 【請求項 18】

01-180活性のモジュレーターのスクリーニング方法であって、  
01-180ポリペプチドを発現させる細胞を用意するステップ、  
前記細胞を候補モジュレーターと接触させるステップ、  
01-180発現を測定するステップ、および  
前記候補モジュレーター存在下での前記01-180発現を、前記候補モジュレーター不在下での01-180発現の発現と比較するステップ  
を含み、前記候補モジュレーター不在下での01-180の発現と比較した、前記候補モジュレーター存在下での01-180の発現の相違により、前記候補モジュレーターが、01-180発現のモジュレーターであると同定される方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 19】

01-180の活性を調整する化合物を同定する方法であって、  
 単離された01-180ポリペプチドまたはその機能等価物を取得するステップ、  
 01-180ポリペプチドまたはその機能的等価物を候補化合物と混合するステップ、および  
 01-180の活性に対する前記候補化合物の効果を測定するステップ  
 を含む方法。

## 【請求項 20】

01-180の活性を調整する化合物のスクリーニング方法であって、  
 01-180またはその01-180結合断片を候補化合物に暴露すること、および  
 前記化合物が01-180またはその01-180結合パートナーに結合するかどうかを決定すること 10  
 、そして、  
 さらに前記化合物が01-180または01-180と結合パートナーとの相互作用を調整するかどうかを決定すること、  
 を含む方法。

## 【請求項 21】

01-180と結合する相互作用化合物のスクリーニング方法であって、  
 01-180タンパク質またはその断片をある化合物に暴露すること、および  
 前記化合物が01-180に結合したかどうかを決定すること  
 を含む方法。

## 【請求項 22】

01-180活性に影響を及ぼす化合物を同定する方法であって、  
 (a) (1) 調節可能な1つまたは複数の01-180タンパク質遺伝子、(2) 1つまたは複数の01-180タンパク質遺伝子のノックアウト、または(3) 1つまたは複数の01-180タンパク質遺伝子のノックイン、を持つトランスジェニック動物の群を用意すること、  
 (b) ステップ(a)のトランスジェニック動物の群に対してそれぞれ対照動物からなる第2の群を用意すること、および  
 (c) トランスジェニック動物群および対照動物群を候補01-180調整化合物に暴露すること、および  
 (d) トランスジェニック動物群と対照動物群とを比較し、トランスジェニック動物における不妊または妊性に関係する1つまたは複数のタンパク質に対する前記化合物の効果を対 30  
 照動物と比較して決定すること  
 を含む方法。

## 【請求項 23】

ペプチド結合対の第1ペプチドと第2ペプチドの結合相互作用を検出する方法であって、  
 (i) 選択した表現型を検出するのに適した条件下で少なくとも1つの真核細胞を培養すること(ここに、前記細胞は、  
 a) 転写活性化タンパク質DNA結合ドメインに接合された第1ペプチドまたはそのセグメントを含む第1異種融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列、  
 b) 転写活性化タンパク質転写活性化ドメインに接合された第2ペプチドまたはそのセグメントを含む第2異種融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列 40  
 (ここでは、第1ペプチドまたはそのセグメントと第2ペプチドまたはそのセグメントとの結合によって、転写活性化タンパク質が復元される)、および  
 c) 復元された転写活性化タンパク質の正の転写制御を受けて活性化されるレポーター要素(ここでは、前記レポーター要素の発現が、選択した表現型をもたらす)  
 を含む)、  
 (ii) 選択した表現型をもたらすレポーター要素の発現レベルを決定することによって前記ペプチド結合対の結合相互作用を検出すること、  
 を含み、  
 前記第1または第2ペプチドが01-180ペプチドであり、他方が試験ペプチド、好ましくは卵巣内に存在する選択されたペプチド/タンパク質である方法。 50

## 【請求項 24】

ペプチド結合対の第1ペプチドと第2ペプチドの結合相互作用を検出するためのレスキュースクリーンであって、

(i) 選択した表現型を検出するためまたはそのような表現型の不在を検出するための条件下で少なくとも1つの真核細胞を培養すること(ここに、前記細胞は、

a) 転写活性化タンパク質のDNA結合ドメインに接合された第1ペプチドまたはそのセグメントを含む第1異種融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列、

b) 転写活性化タンパク質の転写活性化ドメインに接合された第2ペプチドまたはそのセグメントを含む第2異種融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列

(ここでは、第1ペプチドまたはそのセグメントと第2ペプチドまたはそのセグメントとの結合によって、転写活性化タンパク質が復元される)、および

c) 復元された転写活性化タンパク質の正の転写制御を受けて活性化されるレポーター要素(ここでは、前記レポーター要素の発現が、選択した表現型の発揮を妨げる)、

(ii) 選択した表現型の発揮を妨げるレポーター要素の発現に試験ペプチドが影響を及ぼすかどうかを決定することによって、01-180と相互作用する試験ペプチドの能力を検出すること

を含み、

前記第1または第2ペプチドが01-180ペプチドであり、他方が試験ペプチド、好ましくは卵巣内に存在する選択されたペプチド/タンパク質である方法。

## 【請求項 25】

01-180の結合パートナーを同定する方法であって、

当該タンパク質を候補結合パートナーに暴露するステップ、および

前記候補結合パートナーが01-180に結合するかどうかを決定するステップを含む方法。

## 【請求項 26】

薬学的に許容できる担体中に分散した01-236発現のモジュレーターを含む医薬組成物。

## 【請求項 27】

モジュレーターが01-236遺伝子の転写を抑制する請求項26の組成物。

## 【請求項 28】

モジュレーターが01-236遺伝子の転写を増進する請求項26の組成物。

## 【請求項 29】

モジュレーターがポリペプチドである請求項26の組成物。

## 【請求項 30】

モジュレーターが小分子である請求項26の組成物。

## 【請求項 31】

モジュレーターがポリヌクレオチド配列である請求項26の組成物。

## 【請求項 32】

ポリヌクレオチド配列がDNAまたはRNAである請求項31の組成物。

## 【請求項 33】

作動的に連結したプロモーターとポリヌクレオチド配列とを含む発現ベクターをさらに含む請求項31の組成物。

## 【請求項 34】

薬学的に許容できる担体中に分散した01-236活性のモジュレーターを含む医薬組成物。

## 【請求項 35】

01-236活性を阻害する請求項34の組成物。

## 【請求項 36】

01-236活性を刺激する請求項34の組成物。

## 【請求項 37】

避妊を調整する方法であって、薬理的に許容できる担体中に分散した01-236活性のモジュレーターの有効量を動物に投与することを含み、前記の量が受胎を減少させることので

10

20

30

40

50

きる方法。

【請求項 38】

動物が雌である請求項37の方法。

【請求項 39】

動物が雄である請求項37の方法。

【請求項 40】

妊性を強化する方法であって、薬理学的に許容できる担体中に分散した01-236活性のモジュレーターの有効量を動物に投与することを含み、前記の量が受胎を増加させることのできる方法。

【請求項 41】

01-236活性のモジュレーターのスクリーニング方法であって、  
01-236ポリペプチドを発現させる細胞を用意するステップ、  
前記細胞を候補モジュレーターと接触させるステップ、  
01-236発現を測定するステップ、および  
前記候補モジュレーター存在下での前記01-236発現を、前記候補モジュレーター不在下での01-236発現の発現と比較するステップ  
を含み、前記候補モジュレーター不在下での01-236の発現と比較した、前記候補モジュレーター存在下での01-236の発現の相違により、前記候補モジュレーターが、01-236発現のモジュレーターであると同定される方法。

【請求項 42】

01-236の活性を調整する化合物を同定する方法であって、  
単離された01-236ポリペプチドまたはその機能等価物を取得するステップ、  
01-236ポリペプチドまたはその機能的等価物を候補化合物と混合するステップ、および  
01-236の活性に対する前記候補化合物の効果を測定するステップ  
を含む方法。

【請求項 43】

01-236の活性を調整する化合物のスクリーニング方法であって、  
01-236またはその01-236結合断片を候補化合物に暴露すること、および  
前記化合物が01-236またはその01-236結合パートナーに結合するかどうかを決定すること、  
そして、  
さらに前記化合物が01-236または01-236と結合パートナーとの相互作用を調整するかどうかを決定すること、  
を含む方法。

【請求項 44】

01-236と結合する相互作用化合物のスクリーニング方法であって、  
01-236タンパク質またはその断片をある化合物に暴露すること、および  
前記化合物が01-236に結合したかどうかを決定すること  
を含む方法。

【請求項 45】

01-236活性に影響を及ぼす化合物を同定する方法であって、  
(a) (1) 調節可能な1つまたは複数の01-180タンパク質遺伝子、(2) 1つまたは複数の01-236タンパク質遺伝子のノックアウト、または(3) 1つまたは複数の01-236タンパク質遺伝子のノックイン、を持つトランスジェニック動物の群を用意すること、  
(b) ステップ(a)のトランスジェニック動物の群に対してそれぞれ対照動物からなる第2の群を用意すること、および  
(c) トランスジェニック動物群および対照動物群を候補01-236調整化合物に暴露すること、および  
(d) トランスジェニック動物群と対照動物群とを比較し、トランスジェニック動物における不妊または妊性に関係する1つまたは複数のタンパク質に対する前記化合物の効果を対照動物と比較して決定すること

10

20

30

40

50

を含む方法。

【請求項 46】

ペプチド結合対の第1ペプチドと第2ペプチドの結合相互作用を検出する方法であって、

(i) 選択した表現型を検出するのに適した条件下で少なくとも1つの真核細胞を培養すること(ここに、前記細胞は、

a) 転写活性化タンパク質DNA結合ドメインに接合された第1ペプチドまたはそのセグメントを含む第1異種融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列、

b) 転写活性化タンパク質転写活性化ドメインに接合された第2ペプチドまたはそのセグメントを含む第2異種融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列

(ここでは、第1ペプチドまたはそのセグメントと第2ペプチドまたはそのセグメントとの結合によって、転写活性化タンパク質が復元される)、および

c) 復元された転写活性化タンパク質の正の転写制御を受けて活性化されるレポーター要素(ここでは、前記レポーター要素の発現が、選択した表現型をもたらす)

を含む)、

(ii) 選択した表現型をもたらすレポーター要素の発現レベルを決定することによって前記ペプチド結合対の結合相互作用を検出すること、

を含み、

前記第1または第2ペプチドが01-236ペプチドであり、他方が試験ペプチド、好ましくは卵巣内に存在する選択されたペプチド/タンパク質である方法。

【請求項 47】

ペプチド結合対の第1ペプチドと第2ペプチドの結合相互作用を検出するためのレスキュースクリーンであって、

(i) 選択した表現型を検出するためまたはそのような表現型の不在を検出するための条件下で少なくとも1つの酵母細胞を培養すること(ここに、前記酵母細胞は、

a) 転写活性化タンパク質のDNA結合ドメインに接合された第1ペプチドまたはそのセグメントを含む第1異種融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列、

b) 転写活性化タンパク質の転写活性化ドメインに接合された第2ペプチドまたはそのセグメントを含む第2異種融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列

(ここでは、第1ペプチドまたはそのセグメントと第2ペプチドまたはそのセグメントとの結合によって、転写活性化タンパク質が復元される)、および

c) 復元された転写活性化タンパク質の正の転写制御を受けて活性化されるレポーター要素(ここでは、前記レポーター要素の発現が、選択した表現型の発揮を妨げる)、

(ii) 選択した表現型の発揮を妨げるレポーター要素の発現に試験ペプチドが影響を及ぼすかどうかを決定することによって、01-236と相互作用する試験ペプチドの能力を検出すること

を含み、

前記第1または第2ペプチドが01-236ペプチドであり、他方が試験ペプチド、好ましくは卵巣内に存在する選択されたペプチド/タンパク質である方法。

【請求項 48】

01-236の結合パートナーを同定する方法であって、

当該タンパク質を候補結合パートナーに暴露するステップ、および

前記候補結合パートナーが01-236に結合するかどうかを決定するステップ

を含む方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は概して卵巣特異的遺伝子およびそれらがコードするタンパク質に関する。本願は、米国仮特許出願第60/106,020号(1998年10月28日出願)に基づく優先権を主張する国際出願第PCT/US99/25209号(1999年10月28日出願)の一部継続出願である米国特許出願第09/844,864号(2001年4月27日出願)の一部継続出願である。

10

20

30

40

50

## 【背景技術】

## 【0002】

生殖発生および性機能は遺伝的に決定される事象と生理学的事象の両方が関与する複雑な過程である。これらの過程がどのような調節を受けるかを特徴づけるには、これらの過程に関与する重要なタンパク質遺伝子産物を同定する必要がある。哺乳類の卵形成および卵胞形成の初期相では重要な分子事象が起こるが、今までのところ、同定され十分に特徴づけられた「候補」調節分子はほとんどない。下垂体から分泌される黄体形成ホルモン（LH）および卵胞刺激ホルモン（FSH）などのエンドクリン因子と、卵母細胞から分泌されるパラクリン因子は、どちらも卵胞形成に影響を及ぼすことが、いくつかの研究によって示唆されている。FSHおよびLHは、卵母細胞の成長および成熟ならびに卵母細胞減数分裂能力の維持に必要な顆粒膜細胞および莢膜細胞に結合することが知られている。同様に、卵母細胞も正常な顆粒膜細胞機能および莢膜細胞機能に必要な因子を分泌するだろう。卵母細胞の成長は周囲の体細胞（すなわち最初は顆粒膜細胞、後に莢膜細胞）の発育および成長と協調するので、初期段階での分子事象を理解することにより、卵母細胞と体細胞の間の互惠的相互作用を媒介するパラクリン因子、栄養ホルモンの刺激に対する応答能力の発達、および卵胞動員の過程に関して、重要な手がかりが得られるだろう。

10

## 【0003】

合成エストロゲンおよびプロゲステンを含有するステロイドの投与による視床下部-下垂体-性腺生殖軸の破壊は最も古いホルモン避妊法の一つである。しかし、米国医学研究所（Institute of Medicine）の最新の報告では、新しい避妊手段のための戦略を開発することの重要性が強調されている。この報告によると、一部の婦人用長期避妊戦略は、排卵の抑制、受精の防止、または受精卵の子宮内膜への着床の妨害を含む。また、約15%の夫婦は不妊であり、それらの症例の約40%では、女性がその不妊の唯一の原因であると考えられる。したがって、新しい避妊薬の標的候補となりうる新規卵巢特異的遺伝子産物を同定することは非常に重要である。

20

## 【0004】

卵巢の一機能は、受精および初期胚発生に必要なタンパク質および因子をすべて供給する能力を完全に持っている卵母細胞を産生することである。卵母細胞由来のmRNAおよびタンパク質は、精子核膜、精子核の脱凝縮（プロタミンの除去を含む）、精子DNAでのヒストンの集合およびクロマチン凝縮、卵母細胞の卵成熟の完了および第二極体の放出、雄性前核および雌性前核の形成、雄性前核および雌性前核の融合、DNAの複製、ならびに接合子および初期胚分割の開始に必要である[Perreault（1992）の総説がある]。精子は主としてDNAを含む（すなわち細胞質または核質を含まない）ので、卵母細胞由来の因子が必要であり、哺乳動物における初期受精後事象に必要な因子の多くは卵母細胞の卵成熟中に獲得される（McLayおよびClarke、1997）。卵母細胞は異種精子核または異種体細胞核を効率よく前核に作りかえることができるので、これらの卵母細胞タンパク質は進化の過程で高度に保存されていると予想される（Perreault、1992）。精子クロマチンの修飾にヒストンが関与する点は体細胞と似ているが、これらの過程に関与する他の非ヒストンタンパク質は哺乳動物ではわかっていない。アフリカツメガエル（*Xenopus laevis*）の場合、精子脱凝縮の鍵因子は、10年以上前に単離されクローニングされたヌクレオプラスミンである（Burglinら、1987；Dingwallら、1987）。精子クロマチン脱凝縮は精子が卵子に進入した後に起こる。アフリカツメガエルの場合、卵細胞質グルタチオンによるプロタミンジスルフィド結合の減少も重要であるが、精子核の脱凝縮を開始するにはヌクレオプラスミン（ヌクレオプラスミンAまたはXnp2とも呼ばれる）が必要であり、ヌクレオプラスミンがあれば十分である（Philpottら、1991）。酸性の熱安定性タンパク質であるヌクレオプラスミンは、アフリカツメガエルの卵母細胞および卵の核内にもっとも豊富に存在するタンパク質であり、核タンパク質全体の7～10%を占めている（KrohneおよびFranke、1980a；Millsら、1980）。卵核胞崩壊後に、ヌクレオプラスミン[卵核質に存在するがDNAには結合していない（Millsら、1980）]は卵質中に放出され、そこでプロタミンを強固に結合して、精子進入から5分以内にプロタミンを精子核から取り除くことにより、精子脱

30

40

50

凝縮をもたらすように機能する (OhsumiおよびKatagiri, 1991; PhilpottおよびLeno, 1992; Philpottら, 1991)。この過程により、続いて卵子ヒストンが精子DNAを結合することができるようになる。卵子抽出物からヌクレオプラスミンをイムノディプリーションすると精子脱凝縮が妨げられる (Philpottら, 1991)。ヌクレオプラスミンとプロタミンとの直接的相互作用がインビトロ実験で観察されたが、その観察から、ヌクレオプラスミンはプロタミンに1:1の比で結合すること、およびヌクレオプラスミン中のポリグルタミン酸区間が、プロタミンへの結合に決定的な役割を果たすことが示唆される (Iwataら, 1999)。興味深いことに、卵母細胞核、受精卵の雄性もしくは雌性前核、または2細胞胚の核への精子DNAの注入は精子脱凝縮につながることから (Maedaら, 1998)、ヌクレオプラスミンはこれらの段階のすべてで機能することが示唆される。ヌクレオプラスミンは五量体としてヒストンと相互作用することもできる (Earnshawら, 1980; Laskeyら, 1993)。ヌクレオプラスミンはヒストンH2AおよびH2Bに特異的に結合し、ヒストンH3およびH4を結合するタンパク質N1/N2と共に、DNAでのヌクレオソーム構築を促進することができる (Dilworthら, 1987; Laskeyら, 1993)。したがってこれらの知見から、卵形成中ならびに卵形成中と受精時に、卵母細胞由来のヌクレオプラスミンは雌性前核および雄性前核と相互作用し、ヒストンと相互作用し、クロマチン構築に何らかの形で必要とされていることが示唆される (Laskeyら, 1993; Philpottら, 1991)。ヌクレオプラスミンに対して低いホモロジーを持つ「遍在的」タンパク質が哺乳動物およびショウジョウバエ (*Drosophila*) でクローニングされているが (Chanら, 1989; Crevelら, 1997; Itoら, 1996; MacArthurおよびShackelford, 1997b; Schmidt-ZachmannおよびFranke, 1988)、哺乳動物での卵母細胞等価オルソログはまだ同定されていない。

10

20

#### 【0005】

卵巣内の基本機能単位は卵胞であり、これは卵母細胞とそれを取り巻く体細胞とからなっている。雌性哺乳動物における妊性は、月経周期の中期に受精可能な卵母細胞を排卵するグラフ (排卵前) (排卵前) 卵胞を卵巣が産生することができるかどうか依存している (EricksonおよびShimasaki, 2000)。卵胞形成と呼ばれるこの過程には、卵巣外因子と卵巣内因子との精密な協調的調節が必要である (Richardsら, 1995)。卵母細胞-体細胞コミュニケーションは古くから重要であると認識されてきたが (Falck, 1959)、視床下部レベル (すなわちGnRH) および下垂体前葉レベル (すなわちFSHおよびLH) での卵巣外調節ホルモンに関する知識に比して、卵巣内のパラクリン因子およびオートクリン因子については、ほとんどわかっていない。卵母細胞が分泌する因子は、卵胞形成中に、周囲の顆粒膜細胞の増殖を促進し、これらの細胞の早すぎる黄体化を抑制することを示す証拠が、蓄積されつつある (El-Foulyら, 1970; Channing, 1970)。卵母細胞因子は、ヒアルロン酸、ウロキナーゼプラスミノゲン活性化因子 (uPA)、LH受容体、ステロイドおよびプロスタグランジンおよびプロスタグランジンの顆粒膜細胞による合成の制御に関与づけられている (El-Foulyら, 1970; NekolaおよびNalbandov, 1971; Salustriら, 1985; Van derhydenら, 1993; Eppigら, 1997a, b)。

30

#### 【0006】

最近、卵母細胞内にいくつかの新規調節タンパク質が発見された。トランスフォーミング成長因子b (TGF- $\beta$ ) スーパーファミリーのメンバーである成長分化因子9 (GDF-9またはGdf9) はもっとも重要なシグナリング因子の一つである。マウスの場合、GDF-9の卵母細胞での発現は一次卵胞段階で始まり、排卵まで持続する (McGrathら, 1995; Elvinら, 2000)。雌Gdf9 ノックアウトマウスは3b型 (一次) 卵胞段階で卵胞形成が妨害され、顆粒膜細胞の成長および分化、莢膜細胞形成および卵母細胞の減数分裂能力の欠損を伴うので、不妊である (Dongら, 1996; Carabatsosら, 1998; Elvinら, 1999A)。また、組換えGDF-9は、ヒアルロナンシンターゼ2 (Has2)、シクロオキシゲナーゼ2 (Cox2)、ステロイド産生急性調節タンパク質 (StAR)、プロスタグランジンE2受容体EP2、ペントラキシン (pentaraxin) 3、LH受容体およびuPAをコードする遺伝子の発現に影響を及ぼす (Elvinら, 1999B; Elvinら, 2000)。

40

#### 【0007】

50



視床下部-下垂体-性腺軸の鍵タンパク質を同定するために、重要なノックアウトマウスモデルが、卵巢欠損を持つ4つのモデルを含めて、いくつか作出されている。性腺/下垂体ペプチドであるインヒピンが欠損しているマウスは、わずか4週齢で現れる卵巢腫瘍または精巣腫瘍の発症により、続発性不妊を呈する (Matzukら、1992)。II型アクチビン受容体 (Acvr2) が欠損しているマウスは成体期まで生き延びるが、生殖欠損を示す。雄マウスには精巣サイズの低下がみられ、妊性の遅延が認められる (Matzukら、1995)。これに対して、雌マウスは初期胞状卵胞段階での卵胞形成に不妊につながる障害を持つ。FSHホメオスタシスにアクチビンが果たす既知の役割と合致して、これらのAcvr2ノックアウトマウスでは、下垂体FSHレベルと血清中FSHレベルの両方が劇的に低下する。FSHb遺伝子の突然変異のせいでFSHが欠損している雌マウスは不妊である (Kumarら、1997)。しかしこれらのマウスでは、胞状卵胞形成の前に、早期に卵胞形成が妨害される。したがって、FSHは多層前胞状卵胞の形成には必要ないが、胞状卵胞形成への進行には必要である。最後に、成長分化因子9 (Gdf9) ノックアウトマウスを使って、卵胞発育のどの段階でGDF-9が必要とされるかが決定されている (Dongら、1996)。卵巢内では、Gdf9mRNAの発現は卵母細胞に限定され、初期の単層一次卵胞段階で認められ、排卵まで持続する。GDF-9が存在しないと、一次卵巢段階を越えて正常な卵胞を呈示することができない卵巢になる。単層の顆粒膜細胞によって取り囲まれた卵母細胞が存在し、それらは組織学的には正常であるように見えるが、正常な二層型の卵胞は存在しない。単層段階を越えた卵胞は異常であり、異型顆粒膜細胞を含み、これらの細胞の非対称な成長を示す。さらにまた、光学顕微鏡および電子顕微鏡によると、これらのGdf9ノックアウト卵巢では、莢膜細胞層が形成されない (Dongら、1996; Elvinら、1999)。したがって、体細胞によって合成され卵母細胞成長に影響を及ぼすkitリガンドおよび他の成長因子とは対照的に、GDF-9は体細胞機能に必要な卵母細胞由来成長因子として互恵的に機能する。

10

20

【発明の開示】

【0008】

本発明は、3つの卵巢特異的および卵母細胞特異的ポリヌクレオチド配列、01-180 (配列番号1、配列番号11、配列番号12、配列番号13)、01-184 (配列番号3) および01-236 (配列番号5、配列番号7、配列番号8; 配列番号10および配列番号14)、それらがコードするタンパク質産物、その断片および誘導体、ならびにこれらのタンパク質産物と免疫反応する抗体を提供する。これらの遺伝子およびそのタンパク質産物は、さまざまな細胞増殖性障害または細胞変性障害、特に卵巢腫瘍に関わるもの、例えば胚細胞腫瘍および顆粒膜細胞腫、または不妊、例えば早発性卵巢機能不全などに関係するようである。

30

【0009】

したがって一態様として、本発明は、01-180、01-184または01-236に関係する卵巢起源の細胞増殖性障害または細胞変性障害を検出する方法を提供する。もう一つの態様として、本発明は、01-180、01-184または01-236の異常な発現レベルと関係する細胞増殖性障害または細胞変性障害を、それぞれの活性を抑制または強化することによって処置する方法を提供する。

【0010】

特定の一態様として、本発明は、薬学的に許容できる担体中に分散した01-180、01-184および/または01-236発現のモジュレーターを含む医薬組成物を提供する。本モジュレーターは01-180、01-184および/または01-236遺伝子の転写を抑制または増進することができる。本モジュレーターは、ポリペプチド配列、タンパク質、小分子、またはポリヌクレオチド配列でありうる。具体的に述べると、ポリヌクレオチド配列はDNAまたはRNAである。さらなる態様では、本ポリヌクレオチド配列は、プロモーターに作動的に連結した状態で発現ベクターに含まれる。

40

【0011】

本発明のもう一つの態様は、薬学的に許容できる担体中に分散した01-180、01-184および/または01-236活性のモジュレーターを含む医薬組成物である。本組成物は01-180、01-184および/または01-236活性を阻害または刺激しうる。本組成物はタンパク質、ポリペプチ

50

ド配列、小分子またはポリヌクレオチド配列でありうる。

【0012】

本発明のもう一つの態様は、避妊を調整する方法であって、薬理学的に許容できる担体中に分散した01-180、01-184および/または01-236活性のモジュレーターの有効量を動物に投与することを含み、前記の量が受胎を減少させることのできる方法である。動物は雄でも雌でもよい。

【0013】

もう一つの態様は、妊性を強化する方法であって、薬理学的に許容できる担体中に分散した01-180、01-184および/または01-236活性のモジュレーターの有効量を動物に投与することを含み、前記の量が受胎を増加させることのできる方法である。

10

【0014】

さらにもう一つの態様は、01-180、01-184および/または01-236活性のモジュレーターのスクリーニング方法であって、01-180、01-184および/または01-236ポリペプチドを発現させる細胞を用意するステップ、前記細胞を候補モジュレーターと接触させるステップ、01-180、01-184および/または01-236発現を測定するステップ、および候補モジュレーター存在下での01-180、01-184および/または01-236発現を、候補モジュレーター不在下での01-180、01-184および/または01-236発現の発現と比較するステップを含み、候補モジュレーター不在下での01-180、01-184および/または01-236の発現と比較した、候補モジュレーター存在下での01-180、01-184および/または01-236の発現の相違により、当該候補モジュレーターが、01-180、01-184および/または01-236発現のモジュレーターであると同定される方法である。

20

【0015】

本発明の一特定態様は、01-180、01-184および/または01-236の活性を調整する化合物を同定する方法であって、単離された01-180、01-184および/または01-236ポリペプチドまたはその機能等価物を取得するステップ、01-180、01-184および/または01-236ポリペプチドまたはその機能的等価物を候補化合物と混合するステップ、および01-180、01-184および/または01-236の活性に対する前記候補化合物の効果を測定するステップを含む方法である。

【0016】

もう一つの態様は、01-180、01-184および/または01-236の活性を調整する化合物のスクリーニング方法であって、01-180、01-184および/または01-236またはその01-180、01-184および/または01-236結合断片を候補化合物に暴露すること、および前記化合物が01-180、01-184および/または01-236またはその01-180、01-184および/または01-236結合パートナーに結合するかどうかを決定すること、そしてさらに前記化合物が01-180または01-180と結合パートナーとの相互作用を調整するかどうかを決定することを含む方法である。

30

【0017】

さらにもう一つの態様は、01-180、01-184および/または01-236と結合する相互作用化合物のスクリーニング方法であって、01-180、01-184および/または01-236タンパク質またはその断片をある化合物に暴露すること、および前記化合物が01-180、01-184および/または01-236に結合したかどうかを決定することを含む方法である。

40

【0018】

もう一つの態様は、01-180、01-184および/または01-236活性に影響を及ぼす化合物を同定する方法であって、(1)調節可能な1つまたは複数の01-180、01-184および/または01-236タンパク質遺伝子、(2)1つまたは複数の01-180、01-184および/または01-236タンパク質遺伝子のノックアウト、または(3)1つまたは複数の01-180、01-184および/または01-236タンパク質遺伝子のノックイン、を持つトランスジェニック動物の群を用意すること、トランスジェニック動物の群に対してそれぞれ対照動物からなる第2の群を用意すること、およびトランスジェニック動物群および対照動物群を候補01-180、01-184および/または01-236調整化合物に暴露すること、およびトランスジェニック動物群と対照動物群とを比較すること、およびトランスジェニック動物における不妊または妊性に関係する1つ

50

または複数のタンパク質に対する当該化合物の効果を対照動物と比較して決定することを含む方法である。

【0019】

特定の態様として、本発明は、ペプチド結合対の第1ペプチドと第2ペプチドの結合相互作用を検出する方法であって、選択した表現型を検出するのに適した条件下で少なくとも1つの真核細胞を培養すること[ここに、前記細胞は、転写活性化タンパク質DNA結合ドメインに接合された第1ペプチドまたはそのセグメントを含む第1異種融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列、転写活性化タンパク質転写活性化ドメインに接合された第2ペプチドまたはそのセグメントを含む第2異種融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列(ここでは、第1ペプチドまたはそのセグメントと第2ペプチドまたはそのセグメントとの結合によって、転写活性化タンパク質が復元される)、および復元された転写活性化タンパク質の正の転写制御を受けて活性化されるレポーター要素(ここでは、前記レポーター要素の発現が、選択した表現型をもたらす)を含む]、選択した表現型をもたらすレポーター要素の発現レベルを決定することによって前記ペプチド結合対の結合相互作用を検出することを含み、前記第1または第2ペプチドが01-180、01-184および/または01-236ペプチドであり、他方が試験ペプチド、好ましくは生殖組織内に存在する選択されたペプチド/タンパク質である方法を提供する。特定の態様では、生殖組織が卵巣または精巣である。他の生殖組織として子宮、膈、卵管、頸部、性腺、輸精管、前立腺、精嚢および精巣上体も挙げることができる。

10

【0020】

もう1つの態様は、ペプチド結合対の第1ペプチドと第2ペプチドの結合相互作用を検出するためのレスキュースクリーンであって、選択した表現型を検出するためまたはそのような表現型の不在を検出するための条件下で少なくとも1つの真核細胞を培養すること(ここに、前記細胞は、転写活性化タンパク質のDNA結合ドメインに接合された第1ペプチドまたはそのセグメントを含む第1異種融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列、転写活性化タンパク質の転写活性化ドメインに接合された第2ペプチドまたはそのセグメントを含む第2異種融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列(ここでは、第1ペプチドまたはそのセグメントと第2ペプチドまたはそのセグメントとの結合によって、転写活性化タンパク質が復元される)、および復元された転写活性化タンパク質の正の転写制御を受けて活性化されるレポーター要素(ここでは、前記レポーター要素の発現が、選択した表現型の発現を妨げる)、選択した表現型の発現を妨げるレポーター要素の発現に試験ペプチドが影響を及ぼすかどうかを決定することによって01-180、01-184および/または01-236と相互作用する試験ペプチドの能力を検出すること、を含み、前記第1または第2ペプチドが01-180、01-184および/または01-236ペプチドであり、他方が試験ペプチド、好ましくは生殖組織内に存在する選択されたペプチド/タンパク質である方法である。特定の態様では、生殖組織が卵巣または精巣である。

20

30

【0021】

さらにもう一つの態様は、01-180、01-184および/または01-236の結合パートナーを同定する方法であって、当該タンパク質を結合パートナー候補に暴露するステップ、および前記結合パートナー候補が01-180、01-184および/または01-236に結合するかどうかを決定するステップを含む方法である。

40

【0022】

本発明は、卵巣の発育および機能を研究するための、重要なインビトロおよびインビボ試薬を提供する。これらの試薬の考えうる用途は広範囲にわたり、発生の研究道具としての使用から癌に対する治療用試薬にまで及ぶと予想される。これら新規卵巣遺伝子産物の主用途は、婦人の排卵を可逆的または不可逆的に妨害するための候補避妊手段を評価するための試薬として、それらを使用することである。これらの新規卵巣遺伝子産物は、いくつかの形態のヒト不妊または婦人科癌もしくは他の生殖組織関連癌に関係するこれらのシグナリング経路の構成要素における遺伝子突然変異に関するスクリーニングにも役立つと予想される。また、これらの遺伝子またはシグナリング経路に突然変異を持つヒトの表現型

50

によつては、本発明者らは、これらの新規卵巣遺伝子産物を試薬ツールとして使用することにより、母性効果遺伝子として、卵形成、卵胞形成および/または初期胚形成をさらに研究するための突然変異マウスをいくつか作出しようとするだろう。そのようなノックアウトマウスモデルにより、女性の生殖におけるこれらの遺伝子産物の役割に関する重要な洞察が得られ、新しい避妊手段を評価するための実用的試薬としてこれらの遺伝子産物を使用することが可能になる。

#### 【0023】

上記の説明は、以下に述べる本発明の詳細な説明がより良く理解されるように、本発明の特徴および技術上の利点をかなり大まかに概説したものである。以下に、本願特許請求の範囲の主題を形成する本発明の他の特徴および利点を説明する。本明細書に開示する概念および特定態様は、同じ本発明の目的を果たすために他の構造を変更または設計する際の基礎としてすぐに利用できることは、当業者には理解されるはずである。また、そのような等価な構築物は本願特許請求の範囲に記載する本発明の精神および範囲から逸脱しないことも、当業者にはわかるはずである。その構成と作動方法の両方に関して本発明に特有であると考えられる新規な特徴は、さらなる目的および利点と共に、以下の説明を添付の図面と一緒に考慮することにより、より良く理解されるだろう。ただし、各図面は本発明を例示し説明するためだけにあるのであって、各図面が本発明の範囲を規定するものではないことは、明確に理解すべきである。

10

#### 【0024】

本発明がより完全に理解されるように、添付の図面を参照して、本発明を以下に説明する。

20

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0025】

本願に開示する発明には、本発明の範囲および精神から逸脱することなく、さまざまな態様および変更が可能であることは、当業者には明白である。

#### 【0026】

本願において、特許請求の範囲および/または明細書中に「を含む (comprising)」という用語と一緒に「a」または「an」という単語を使用する場合、これは「1つ」を意味するが、「1つ以上」「少なくとも1つ」および「1つまたは複数」の意味とも一致する。

#### 【0027】

本明細書で使用する「動物」という用語は、ヒト、非ヒト霊長類、ウマ、ウシ、ゾウ、ネコ、イヌ、ラットまたはマウスなどの哺乳動物を指す。特定の態様では、動物はヒトである。

30

#### 【0028】

本明細書で使用する「抗体」という用語は、例えばIgG、IgM、IgA、IgDおよびIgEなどの任意の免疫学的結合剤を、広く表すものとする。一般的にはIgGおよび/またはIgMが好ましい。なぜなら、これらは、生理学的状況でもっともよく見られる抗体であり、研究室でも最も容易に作製することができるからである。したがって当業者であれば、「抗体」という用語は、抗原結合領域を持つ任意の抗体様分子を指し、例えばFab'、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、単独ドメイン抗体 (DAB)、Fv、scFv (単鎖Fv) などの抗体断片を包含すると理解する。抗体に基づくさまざまなコンストラクトおよび断片を製造し使用するための技術は、当技術分野ではよく知られている (例えば「Antibodies: A Laboratory Manual」(コールドスプリングハーバー研究所, 1988) を参照されたい)。

40

#### 【0029】

本明細書で使用する「結合タンパク質」という用語は、特定のリガンドに対して結合親和性を示すタンパク質を指す。結合タンパク質は、別々の相異なる遺伝子から産生されうる。ある与えられたリガンドに関して、特定の遺伝子から産生される結合タンパク質は、受容体のリガンド結合ドメインまたはその可溶性受容体とは異なる。

#### 【0030】

本明細書で使用する「受胎」という用語は、雄の精子と雌の卵子の合体、受精を意味する

50

。

## 【0031】

本明細書で使用する「避妊」という用語は、受胎の防止または妨害を指す。したがって避妊具は、受胎を防止する任意のプロセス、器具、または方法を指す。よく知られている避妊手段の種類には、ステロイド、化学的障壁、物理的障壁、化学的障壁と物理的障壁の併用、問題にしている生殖抗原に対する抗体を投与するかまたは投与された生殖抗原に対して自然の免疫応答を発生させることによる免疫避妊方法の使用、禁欲および永久的な外科手術などがある。避妊手段は雄または雌に適用することができる。

## 【0032】

本明細書で使用する「DNA」という用語はデオキシリボ核酸と定義される。

10

## 【0033】

本明細書で使用する「DNAセグメント」という用語は、ある特定種のゲノムDNA全体からは分離されているDNA分子を指す。「DNAセグメント」という用語には、DNAセグメントと、そのようなセグメントよりも小さい断片が包含され、例えばプラスミド、コスミド、ファージ、ウイルスなどを含む組換えベクターも包含される。

## 【0034】

本明細書で使用する「発現コンストラクト」または「導入遺伝子」という用語は、遺伝子産物をコードする核酸を含んでいて、その核酸コード配列の一部または全部が転写を受ける能力を持つ、あらゆるタイプの遺伝子コンストラクトと定義され、ベクターに挿入することができる。転写物はタンパク質に翻訳されるが、その必要はない。ある態様では、遺伝子の転写とmRNAの遺伝子産物への翻訳との両方が、発現に含まれる。別の態様では、問題にしている核酸コード遺伝子の転写だけが、発現に含まれる。本発明では、発現コンストラクトまたは導入遺伝子を指すために「治療用コンストラクト」という用語を使用する場合もある。本発明が、不妊を処置するための治療法として発現コンストラクトまたは導入遺伝子を利用することは、当業者であればわかる。さらに本発明では、発現コンストラクトまたは導入遺伝子を、避妊のための「予防用コンストラクト」として利用する。したがって「予防用コンストラクト」は避妊手段である。

20

## 【0035】

本明細書で使用する「発現ベクター」という用語は、ある遺伝子産物の少なくとも一部をコードしていて転写されうる核酸配列を含んでいるベクターを指す。一部の例では、RNA分子がさらにタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドに翻訳される。また、他の例、例えばアンチセンス分子またはリボザイムを製造する例では、これらの配列は転写されない。発現ベクターはさまざまな制御配列を含むことができる。制御配列とは、特定の宿主生物内で作動的に連結されたコード配列の転写に必要な、そして場合によっては翻訳に必要な核酸配列を指す。ベクターおよび発現ベクターは、転写および翻訳を支配する制御配列だけでなく、他の機能も果たす後述の核酸配列も含むことができる。

30

## 【0036】

本明細書で使用する「遺伝子」という用語は、機能的なタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドをコードする単位を簡潔に示すために用いられる。この機能的用語は、タンパク質、ポリペプチド、ドメイン、ペプチド、融合タンパク質および突然変異体を発現させるか、またはそれらを発現させるように改造することができる、ゲノム配列、cDNA配列および操作されたセグメントを包含する。例えば、「天然遺伝子」という用語が、自分自身の調節配列を持つ自然界に見いだされるままの遺伝子を指し、「キメラ遺伝子」という用語が、自然界では一緒には見いだされない調節配列とコード配列を含む天然遺伝子ではない任意の遺伝子を指すことは、当業者には知られている。したがってキメラ遺伝子は、異なる供給源に由来する調節配列とコード配列、または同じ供給源に由来するが自然界に見いだされる配置とは異なる形で配置されている調節配列とコード配列を含みうる。

40

## 【0037】

本明細書で使用する「妊性」という用語は、生殖能力を持つまたは受胎能力を持つという特性を指す。妊性は雄性動物にも雌性動物にも関係する。

50

## 【0038】

「過剰増殖性疾患」という用語は、細胞の過剰増殖によって起こる疾患と定義される。過剰増殖性疾患はさらに癌と定義される。細胞の過剰増殖は、無秩序な成長、分化の欠如、局所組織浸潤、および転移をもたらす。代表的な過剰増殖性疾患には、例えば癌または自己免疫疾患などが含まれる。他の過剰増殖性疾患には、血管閉塞、再狭窄、アテローム性動脈硬化、または炎症性腸疾患を含めることができる。

## 【0039】

本明細書で使用する「不妊」という用語は、受胎または子孫を生む能力がないか、その能力の低下を指す。不妊は雄または雌に存在しうる。本発明では、不妊を強化するためまたは妊性を低下させるために行われる組成物の投与は可逆的である。

10

## 【0040】

本明細書で使用する用語「01-180」と「0o1」は可換である。

## 【0041】

本明細書で使用する用語「01-236」、「Npm2」または「NPM2」は可換である。

## 【0042】

本明細書で使用する「ペプチド結合対」という用語は、既知の結合親和性を持ち、そのDNA配列がわかっているまたは推定することができる、任意のペプチド対を指す。ペプチド結合対のペプチドは、改変細胞の他のどの成分に対しても、互いに選択的な結合を示さなければならない。

## 【0043】

本明細書にいう「薬学的に許容できる担体」は、ありとあらゆる溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤、抗真菌剤、浸透圧調節剤、吸収遅延剤などを包含する。医薬活性物質へのそのような媒質および薬剤の使用は、当技術分野ではよく知られている。通常の媒質または薬剤は、それが本発明のベクターまたは細胞と適合しない場合を除き、治療用および/または予防用組成物への使用が考えられる。組成物には追加活性成分も組み込むことができる。

20

## 【0044】

本明細書で使用する「ポリヌクレオチド」という用語は、ヌクレオチドの鎖と定義される。さらに、核酸はヌクレオチドのポリマーである。したがって、本明細書にいう核酸とポリヌクレオチドとは可換である。当業者は、核酸がポリヌクレオチドであり、これを「ヌクレオチド」モノマーに加水分解できるという一般知識を持っている。ヌクレオチドモノマーはヌクレオシドに加水分解することができる。本明細書にいうポリヌクレオチドには、例えば当技術分野で利用できる任意の手段によって得られる核酸配列、例えば組換え手段（すなわち通常のクローニング技術およびPCR（登録商標）などを使って組換えライブラリーまたは細胞ゲノムから行われる核酸配列のクローニングなど）によって得られる核酸配列、および合成手段によって得られる核酸配列がすべて含まれるが、これらに限るわけではない。さらに、ポリヌクレオチドがポリヌクレオチドの突然変異、例えば当技術分野で周知の方法によるヌクレオチドまたはヌクレオシドの突然変異などを包含することは、当業者には知られている。

30

## 【0045】

本明細書で使用する「ポリペプチド」という用語は、通常一定の配列を有するアミノ酸残基の鎖と定義される。本明細書で使用する用語ポリペプチドは、用語「ペプチド」および「タンパク質」と可換である。

40

## 【0046】

本明細書で使用する「プロモーター」という用語は、細胞の合成機構または導入された合成機構によって認識されるDNA配列であって、遺伝子の特異的転写を開始するために必要なDNA配列と定義される。

## 【0047】

本明細書で使用する「精製されたタンパク質またはペプチド」という用語は、他の成分から分離することができる組成物を指すものとし、タンパク質またはペプチドは、その天然

50

に得られる状態と比較して、任意の程度に精製される。したがって精製されたタンパク質またはペプチドは、それが天然に存在しうる環境から解放されたタンパク質またはペプチドも指す。

【0048】

本明細書で使用する「RNA」という用語はリボ核酸と定義される。

【0049】

本明細書で使用する「RNA干渉」または「iRNA」という用語は、問題にしている特定遺伝子を抑制するために用いられるRNA分子である。

【0050】

本明細書で使用する「転写制御下」または「作動的に連結」という用語は、RNAポリメラーゼ開始および遺伝子の発現を制御するための核酸に対して、遺伝子のプロモーターが正しい位置および向きにあることと定義される。

【0051】

卵巣の生理機能、受精および初期分割事象に重要な機能を果たしうる他の新規卵巣発現遺伝子を同定することを目指して、本発明者らはサブトラクティブハイブリダイゼーション法を使用した。卵形成、卵胞形成、受精および/または初期胚形成の調節に重要ないくつかの新規卵母細胞発現遺伝子が、本発明者らによって同定された。これらの卵母細胞特異的遺伝子産物の一つ、ヌクレオプラスミン2 (01-236またはNPM2) は、アフリカツメガエル・ヌクレオプラスミン (xNPM2) の哺乳類オルソログである (Burglinら、1987; Dingwallら、1987)。NPM2の207アミノ酸オープンリーディングフレームは、ヌクレオプラスミンまたはヌクレオフォスミンと呼ばれるタンパク質のファミリーに対して高いホモロジーを示した (呼称 = 種: NPM2ヒト遺伝子、Npm2マウス遺伝子、およびXnpm2アフリカツメガエル遺伝子; NPM2 = あらゆる種のタンパク質)。ヒトヌクレオフォスミン遺伝子 (NPM1, N038とも呼ばれる; アクセッション番号M23613) はヒト染色体5q35に位置し、294アミノ酸のタンパク質をコードし、マウス (Npm1, B23とも呼ばれる, アクセッション番号Q61937) およびアフリカツメガエル (Xnpm1またはN038、アクセッション番号X05496) にオルソログを持つ。マウス19番染色体にマッピングされているマウスヌクレオプラスミン/ヌクレオフォスミンホモログNpm3は、175アミノ酸のタンパク質 [アクセッション番号U64450 (MacArthurおよびShackelford、1997a)] をコードし、ヒトNPM3ホモログ遺伝子 (アクセッション番号AF081280) があるようである。Npm2とは対照的に、Npm1およびNpm3遺伝子は遍在的に発現し、マウスNpm2遺伝子の構造はマウスNpm3遺伝子と比べるとかなり異なっている (MacArthurおよびShackelford、1997a)。

【0052】

本発明者らは、Npm2 cDNA配列を使って、マウスNpm2遺伝子およびヒトNPM2 cDNAおよび遺伝子を取得し、これらの遺伝子をマッピングした。Npm2を欠くマウスは、初期受精後分割事象に異常があるために、妊性に欠損を持つ。アフリカツメガエル卵母細胞および卵子中に最も豊富に存在する核タンパク質の哺乳類ホモログの発見 (KrohneおよびFranke、1980a; Millsら、1980) は、哺乳動物における卵形成、受精および受精後発生の明確な理解にとって重要であり、またおそらくは哺乳類クローン化実験に必要なさらなる卵母細胞因子を明らかにするためにも重要である。

【0053】

また、いくつかの研究により、ヌクレオプラスミンのリン酸化はその機能に影響を及ぼすことが示されている。卵母細胞 (すなわち卵巣中にあるもの) と卵子 (すなわち排卵後、受精準備が整ったもの) から得られる形態のヌクレオプラスミンを比較すると、リン酸化のレベルに劇的な相違が認められる。アフリカツメガエル卵子ヌクレオプラスミンは、卵母細胞型よりもかなり大きく、リン酸化の相違によりSDS-PAGE上で約15,000ダルトン大きく移動する (Sealyら、1986)。ヌクレオプラスミンは卵子では約20個のリン酸基/タンパク質を持つのに対して、卵母細胞では<10リン酸基/タンパク質であり、卵子キナーゼ調製物は卵母細胞ヌクレオプラスミンを修飾して卵子型に似るようにすることができる (Cottenら、1986)。機能面では、ヌクレオプラスミンのこの過剰リン酸化は、その核輸送を

10

20

30

40

50

刺激すると共に (Vancurovaら、1995)、より活性な形態をもたらして、ヌクレオソーム構築の増加 (Sealyら、1986) および精子脱凝縮 (Lenoら、1996) につながる。過剰リン酸化型のヌクレオプラスミンはアフリカツメガエル胚形成の初期段階にも存在し、そこでは、速い細胞周期およびDNA複製中になんらかの機能を果たすと考えられている (Burglinら、1987)。カエルNPM2と哺乳類NPM2ではセリン残基とスレオリン残基の割合が高いことから、哺乳類ヌクレオプラスミン2のリン酸化も哺乳類卵子で同様の役割を持つことが示唆される。リン酸化は、NPM2がいつ作用するかを調節して、重要な時 (すなわち雄性および雌性前核へのヒストン付加または転写停止時) までNPM2を不活性にしておく働きをすることができるだろう。カエルNPM2にも哺乳類NPM2にも多数の推定キナーゼ部位が存在するが、カゼインキナーゼIIはヌクレオプラスミンと特異的に相互作用して、それをリン酸化し、カゼインキナーゼIIの阻害剤はアフリカツメガエルヌクレオプラスミンの核輸送を遮断することができる (Vancurovaら、1995)。興味深いことに、予想されるカゼインキナーゼIIリン酸化部位のうちの2つが、カエル・ヌクレオプラスミン2 (Ser125およびSer177)、マウスNPM2 (Thr123およびSer184) ならびにヒトNPM2 (Thr127およびSer191) の間で保存されている。他のリン酸化部位も重要だと思われるが、インビボでのカゼインキナーゼII-NPM2相互作用が哺乳動物でも予想できるだろう。

10

#### 【0054】

本発明は3つの新規タンパク質01-180 (配列番号2、配列番号16)、01-184 (配列番号4)、01-236 (配列番号6、配列番号9)、それらをコードするポリヌクレオチド配列、ならびにその断片および誘導体を提供する。01-180、01-184、01-236の発現は高度に組織特異的であり、主に卵巢組織の細胞で発現される。一態様として本発明は、01-180、01-184または01-236の発現と関係する卵巢の細胞増殖性障害または細胞変性障害を検出する方法を提供する。もう一つの態様として本発明は、01-01-180、01-184、01-236の異常な発現と関係する細胞増殖性障害または細胞変性障害を、それぞれの活性を抑制または強化する薬剤を使って処置する方法を提供する。

20

#### 【0055】

数多くの他の卵巢特異的タンパク質が持っている既知の活性に基づいて、01-180、01-184および01-236ならびにその断片および誘導体も、それらを診断用試薬および治療用試薬として有用にするような生物学的活性を持つだろうと期待することができる。

#### 【0056】

例えばGDF-9は01-180、01-184および01-236と同様の発現パターンを持つ卵母細胞発現遺伝子産物である。GDF-9を欠くマウスは卵胞発達の極めて初期の段階、単層一次卵胞段階で不妊であることが明らかにされている (Dongら)。これらの研究は、GDF-9機能を遮断する薬剤が避妊薬としてヒト女性に有用であるだろうということを証明している。01-180、01-184および01-236は卵母細胞でGDF-9とほぼ同じ発現パターンを持つので (図2)、上記の知見は、これらの遺伝子産物のすべてのいずれかを欠くマウスおよびヒトまたは他の任意の哺乳動物もまた不妊であるだろうということを示唆している。したがってこれらの遺伝子産物のいずれかまたはすべての機能を遮断すれば、避妊作用が得られるだろう。

30

#### 【0057】

卵巢特異的な発現をすることが見出されているもう一つの調節タンパク質は、FSHの下垂体分泌の特異的かつ強力なポリペプチド阻害物質インヒピンである。インヒピンは卵巢濾胞液から単離されている。インヒピンはFSHを抑制するので、雄でも雌でも避妊手段候補として提案されている。01-180、01-184および01-236も卵巢特異的ペプチドであるから、これらも類似する生物学的活性を持ちうる。インヒピンは一定の卵巢腫瘍のマーカーとして役立つことも示されている (Lappohnら、1989)。01-180、01-184、01-236も卵巢起源の原発性および転移性新生物を同定するためのマーカーとして役立つ。また、インヒピンを欠くマウスは、顆粒膜細胞腫を発症する (Matzukら、1992)。同様に、01-180、01-184および01-236は、出生前スクリーニング法において、発生異常または生殖異常の指標として役立つ。

40

#### 【0058】

50



精巢によって産生され雄の胚で起こるミューラー管の退化を担っているミューラー管抑制因子（MISまたは抗ミューラーホルモン）ペプチドは、ヌードマウスにおけるヒト卵巣癌の成長を抑制することが示されている（Donahoeら、1981）。01-180、01-184および01-236も同様に機能する可能性があり、したがって例えば卵巣癌処置剤などの抗癌剤の標的になりうる。

#### 【0059】

01-180、01-184および01-236タンパク質、そのアゴニストおよびアンタゴニストは、哺乳動物（例えばヒト）の妊性を抑制する（例えば避妊薬として作用する）薬剤を同定するために使用できる。また、01-180、01-184および01-236ならびにそのアゴニストおよびアンタゴニストは、哺乳動物の妊性を強化する（例えばインビボまたはインビトロ受精の成功率を向上させる）薬剤を同定するためにも使用できる。また、これらの卵母細胞発現遺伝子産物または類縁の卵母細胞発現遺伝子産物のアッセイを、不妊の型（例えばこれらの遺伝子産物の活性を解析するアッセイで）または他の疾患（例えば胚細胞腫瘍、多嚢胞性卵巣症候群）を検出するための診断アッセイとして利用することもできる。さらに、これらのタンパク質またはこれらの経路に作用する薬剤は成長刺激因子として機能する可能性もあり、したがってさまざまな細胞集団のインビトロでの生存に役立ちうる。特に01-180、01-184および/または01-236が卵母細胞の成熟に関与するのであれば、それらは、例えば体外受精法の成功率を向上させる際の有用な標的になりうる。

10

#### 【0060】

##### A. タンパク質

本発明は、01-180（配列番号2、配列番号16）、01-184（配列番号4）および01-236（配列番号6、配列番号9）ポリペプチド、タンパク質、またはその薬剤に関する。

20

#### 【0061】

本発明は、完全な01-180、01-184または01-236分子だけでなく、後述する機能を保っているも保っていないくてもよい、それらポリペプチドの断片にも関係する。分子のN末端を含む断片は、遺伝子操作でコード領域内に翻訳停止部位を作ることによって作製することができる。あるいは、01-180、01-184または01-236を、プロテアーゼと呼ばれるタンパク質分解酵素で処理することによって、さまざまなN末端断片、C末端断片および内部断片を製造することもできる。タンパク質の断片は、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号9および配列番号16の配列の連続する6個のアミノ酸と同一な連続する6個のアミノ酸またはそれ以上のアミノ酸を含有する任意のペプチドを包含すると理解される。配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号9および配列番号16の配列のいずれかの、対応する数のアミノ酸と同一な、連続する7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50、55、60、65、75、80、85、90、95、100、200個またはそれ以上のアミノ酸を含有する断片も考えられる。断片は抗体の作製に使用することができる。特に有用な断片は01-180、01-184または01-236のドメインを構成する断片だろう。ドメインは、そのタンパク質の残りの部分がなくても保たれる独立した三次構造を持つタンパク質の一部と定義される。そのような構造は当業者に知られる技術によって見つけることができる。タンパク質をサブチリシン、トリプシン、キモトリプシンなどのプロテアーゼで部分消化した後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけてタンパク質断片を分離する。次に、それらの断片をPVDF膜に転写し、マイクロシーケンシングにかけて、それらの断片のN末端のアミノ酸配列を決定することができる。

30

40

#### 【0062】

本明細書で使用する「実質的に純粋」という用語は、他のタンパク質、脂質、糖質、または01-180、01-184および01-236に天然に付随している他の物質を実質的に含まない01-180、01-184および01-236を指す。当業者は標準的なタンパク質精製法を使って01-180、01-184および01-236を精製することができる。実質的に純粋なポリペプチドは非還元ポリアクリルアミドゲルで単一の主要バンドを与えるだろう。01-180、01-184および01-236ポリペプチドの純度はアミノ末端アミノ酸配列分析によって決定することもできる。01-180、01-184および01-236ポリペプチドには、それらポリペプチドの機能的断片も、それらの活性

50

が残っている限り包含される。01-180、01-184および01-236の生物学的活性を持つ、さらに小さいペプチド。

#### 【0063】

本発明のポリペプチドには、本明細書に開示する配列およびその保存的変異体が包含される。本明細書で使用する「保存的変異」という用語は、あるアミノ残基の、生物学的に類似する別の残基による置換を意味する。保存的変異の例には、イソロイシン、バリン、ロイシンまたはメチオニンなどの疎水性残基の1つによる別の疎水性残基の置換、または極性残基の1つによる別の極性残基の置換、例えばアルギニンによるリジンの置換、グルタミン酸によるアスパラギン酸の置換、またはグルタミンによるアスパラギンの置換などがある。「保存的変異」という用語は、置換ポリペプチドに対して産生させた抗体が無置換ポリペプチドとも免疫反応するという条件で、無置換親アミノ酸の代わりに置換アミノ酸を使用することも包含する。

10

#### 【0064】

組換え01-180、01-184および01-236一次アミノ酸配列の軽微な改変は、本明細書に記載の各01-180、01-184および01-236ポリペプチドと比較して、実質的に等価な活性を持つタンパク質をもたらす。そのような改変は部位特異的突然変異誘発による場合のように意図的であってもよいし、自然発生的であってもよい。これらの改変によって生成するポリペプチドはすべて、01-180、01-184または01-236の生物学的活性がまだ存在する限り、本発明に包含される。さらに、1個または複数個のアミノ酸の欠失も、その生物学的活性を有意に変化させずに、結果として生じる分子の構造の改変をもたらすことができる。これは、より広い用途を持つであろうさらに小さい活性分子の開発につながりうる。例えば01-180、01-184または01-236の生物学的活性には必要とされないかもしれないアミノ末端またはカルボキシ末端アミノ酸を除去することができるだろう。

20

#### 【0065】

「誘導体」という用語は、本発明では、対象化合物を修飾することによって製造され、誘導体化された化合物の活性を破壊しない、通常の専門家の技術で製造し使用することができる任意の分子を意味するものとする。誘導体化された化合物の活性を減少させるが破壊はしない上記の基準に合致する化合物は、「誘導体」という用語の範囲に含まれるとみなす。したがって本発明では、01-180、01-184または01-236の配列と一致する配列のアミノ酸を含む化合物の誘導体は、それが測定可能な量の01-180、01-184または01-236の活性を保っている限り、01-180、01-184または01-236の配列と正確に一致するアミノ酸の配列を含む必要はない。

30

#### 【0066】

同様に、対抗性（例えば拮抗性）を持つタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドを作製する場合も、同じように考えることができる。このことと、01-180、01-184または01-236突然変異体または類似体の作製が行われうる本発明との間には、関連がある。例えば01-180、01-184または01-236突然変異体を作製し、01-180、01-184または01-236活性について試験して、01-180、01-184または01-236活性にとって重要な残基を同定することができる。ヒト集団に存在し、癌の発生に関連づけられる01-180、01-184または01-236突然変異体を再現するために、01-180、01-184または01-236突然変異体を合成することもできる。また、妊性を抑制または強化するために、01-180、01-184または01-236突然変異体をアンタゴニストとして使用することもできる。したがって01-180、01-184または01-236突然変異体は、避妊組成物候補および/または妊性強化組成物候補として使用することができる。

40

#### 【0067】

#### B. 核酸

本発明は01-180（配列番号1、配列番号11、配列番号13および配列番号12）、01-184（配列番号3）または01-236（配列番号5、配列番号7、配列番号8、配列番号10および配列番号14）タンパク質をコードするポリヌクレオチドならびにその断片および誘導体も提供する。これらのポリヌクレオチドには、01-180、01-184または01-236をコードするDNA、cDNAおよびRNA配列が包含される。01-180、01-184および/または01-236の全部または一部をコ

50

ードするポリヌクレオチドもすべて、それらが01-180（配列番号1、配列番号11、配列番号13および配列番号12）、01-184（配列番号3）または01-236（配列番号5、配列番号7、配列番号8、配列番号10および配列番号14）の活性を持つポリペプチドをコードする限り、ここに包含されると理解される。そのようなポリヌクレオチドには、自然に存在するポリヌクレオチド、合成ポリヌクレオチド、および意図的に操作したポリヌクレオチドが包含される。例えば01-180（配列番号1、配列番号11、配列番号13および配列番号12）、01-184（配列番号3）または01-236（配列番号5、配列番号7、配列番号8、配列番号10および配列番号14）のポリヌクレオチドを部位特異的突然変異誘発にかけることができる。01-180、01-184および01-236のポリヌクレオチド配列にはアンチセンス配列も包含される。本発明のポリヌクレオチドには、遺伝コードの結果として縮重している配列が包含される。天然アミノ酸は20種類あるが、その大半は2以上のコドンによって指定される。したがってすべての縮重ヌクレオチド配列は、そのヌクレオチド配列によってコードされる01-180、01-184および01-236ポリペプチドのアミノ酸配列が機能的に不変である限り、本発明に包含される。

10

20

30

40

50

#### 【0068】

本発明のDNA配列は、いくつかの方法で取得することができる。例えば、本DNAは当技術分野で周知のハイブリダイゼーション法または増幅法を使って単離することができる。そのような方法には、例えば1) ゲノムライブラリーまたはcDNAライブラリーとプローブとのハイブリダイゼーションによる相同ヌクレオチド配列の検出、2) 発現ライブラリーの抗体スクリーニングによる、共通する構造上の特徴を持つクローン化DNA断片の検出、または3) これらの配列に関係するオリゴヌクレオチドおよびポリメラーゼ連鎖反応技術の使用などが含まれるが、これらに限るわけではない。

#### 【0069】

本発明の01-180、01-184および01-236ポリヌクレオチドは、好ましくは哺乳類生物に由来し、最も好ましくはマウス、ラット、ゾウ、ブタ、ウシまたはヒトに由来する。核酸ハイブリダイゼーションに基づくスクリーニング方法は、適切なプローブを入手できるのであれば、任意の遺伝子配列を任意の生物から単離することを可能にする。問題のタンパク質をコードする配列の一部に対応するオリゴヌクレオチドプローブは、化学的に合成することができる。これにはアミノ酸配列の短いオリゴペプチドストレッチが既知でなければならない。タンパク質をコードするDNA配列は遺伝コードから推定することができるが、コードの縮重を考慮しなければならない。配列が縮重している場合は混合付加反応を行なうことができる。これには変性二本鎖DNAの不均一混合物が含まれる。そのようなスクリーニングには、ハイブリダイゼーションを、好ましくは、一本鎖DNAまたは変性二本鎖DNAで行なう。ハイブリダイゼーションは、目的のポリペプチドに関係するmRNA配列の存在量が極めて低い供給源に由来するcDNAクローンの検出には特に有用である。言い換えると、非特異的結合を回避するためのストリンジェントなハイブリダイゼーション条件を使用すれば、例えばオートラジオグラフィによる特異的cDNAの可視化を、その完全な相補体である混合物中の単一プローブへの標的DNAのハイブリダイゼーションによって行なうことが可能である（Wallaceら、1981）。

#### 【0070】

01-180、01-184および01-236をコードする特異的DNA配列の開発は、1) 二本鎖DNA配列をゲノムDNAから単離すること、2) 目的のポリペプチドに必要なコドンが得られるようにDNA配列を化学的に製造すること、および3) 真核生物供与細胞から単離されるmRNAの逆転写による二本鎖DNA配列のインビトロ合成、によって達成することもできる。最後の例では、一般にcDNAと呼ばれるmRNAの二本鎖DNA相補体が最終的に生成する。

#### 【0071】

組換え法で使用する上記3つの特異的DNA配列開発法のなかでは、ゲノムDNA単離物の単離が最も一般的でない。これは、哺乳類ポリペプチドの微生物発現を達成することが望ましい場合には、イントロンの存在ゆえに、特にそうであるといえる。

#### 【0072】

DNA配列の合成は、所望のポリペプチド産物のアミノ酸残基の全配列がわかっている場合には、よく選択される方法である。所望のポリペプチドのアミノ酸残基の全配列がわかっていない場合は、DNA配列の直接合成は不可能であり、cDNA配列の合成が選択される方法になる。目的のcDNA配列を単離するための標準的手順には、遺伝子発現レベルが高い供与細胞中の豊富なmRNAの逆転写によって得られるプラスミド型またはファージ型cDNAライブラリーの作製が含まれる。ポリメラーゼ連鎖反応技術と併用すると、希薄な発現産物でさえクローニングすることができる。ポリペプチドのアミノ酸配列のかなりの部分がわかっている場合は、標的cDNA中に存在すると推定される配列を再現した標識一本鎖または二本鎖DNAまたはRNAプローブ配列の製造物を、一本鎖型に変性させたcDNAのクローン化コピーに対して行なわれるDNA/DNAハイブリダイゼーション法に使用することができる (Jayら、1983)。

10

#### 【0073】

Igt11などのcDNA発現ライブラリーは、少なくとも1つのエピトープを持つ01-180、01-184および/または01-236ペプチドについて、01-180、01-184および/または01-236に特異的な抗体を使って、間接的にスクリーニングすることができる。そのような抗体はポリクローナルまたはモノクローナルであることができ、01-180、01-184および/または01-236 cDNAの存在を示す発現産物を検出するために使用することができる。

#### 【0074】

01-180、01-184または01-236をコードするDNA配列は、適切な宿主細胞へのDNA導入によってインビトロで発現させることができる。「宿主細胞」は、その中でベクターが増殖することができる、そのDNAが発現される細胞である。この用語には、対象とする宿主細胞のどの子孫も包含される。複製中には突然変異が起こりうるので、確かに、すべての子孫が親細胞と同一なわけではないかもしれない。しかし「宿主細胞」という用語を使用する場合は、そのような子孫も包含される。当技術分野では安定な導入 (これは外来DNAが宿主中に継続的に維持されることを意味する) の方法が知られている。

20

#### 【0075】

本発明では、01-180、01-184および/または01-236ポリヌクレオチド配列を組換え発現ベクターに挿入することができる。「組換え発現ベクター」という用語は、01-180、01-184または01-236遺伝子配列の挿入または組込みによって操作されたプラスミド、ウイルスまたは当技術分野で知られる他の媒体を指す。そのような発現ベクターは、宿主に挿入された遺伝子配列の効率のよい転写を促進するプロモーター配列を含有する。発現ベクターは通例、複製起点、プロモーターならびに形質転換細胞の表現型選択を可能にする特殊な遺伝子を含有する。本発明での使用に適したベクターには、例えば、細菌で発現させるためのT7系発現ベクター (Rosenbergら、1987)、哺乳類細胞で発現させるためのpMSXND発現ベクター (LeeおよびNathans、1988) および昆虫細胞で発現させるためのバキュロウイルス系ベクターなどがあるが、これらに限るわけではない。DNAセグメントは、例えばプロモーター (例: T7、メタロチオネイン1またはポリヘドリンプロモーター) などの調節配列に作動的に結合した状態でベクター中に存在することができる。01-180、01-184または01-236をコードするポリヌクレオチド配列は、原核生物または真核生物で発現させることができる。宿主には、微生物、酵母、昆虫および哺乳類生物を含めることができる。真核生物配列またはウイルス配列を持つDNA配列を原核生物で発現させる方法は、当技術分野ではよく知られている。当技術分野では、宿主内で発現および複製する能力を持つ生物学的に機能的なウイルスおよびプラスミドDNAベクターが知られている。本発明のDNA配列を組込むには、そのようなベクターが使用される。

30

40

#### 【0076】

組換えDNAによる宿主細胞の形質転換は、当業者によく知られている従来技術によって行なうことができる。宿主が大腸菌などの原核生物である場合は、指数増殖期後に収集し、次いで当技術分野で周知の方法を使ってCaCl<sub>2</sub>法で処理した細胞から、DNAを取り込む能力を持つコンピテント細胞を調製することができる。これに代えて、MgCl<sub>2</sub>またはRbClを使用することもできる。形質転換は、所望であれば宿主細胞のプロトプラストを形成させ

50

た後に行なうこともできる。

【0077】

宿主が真核生物である場合は、リン酸カルシウム共沈物などのDNAトランスフェクション法、マイクロインジェクションなどの従来の機械的方法、エレクトロポレーション、リボソームに封入したプラスミドの挿入、またはウイルスベクターなどを使用することができる。真核生物細胞は、本発明の01-180、01-184または01-236 cDNA配列をコードするDNA配列と、選択可能な表現型をコードする第2の外来DNA分子（ネオマイシン耐性遺伝子など）とで、同時形質転換することもできる。もう一つの方法は、真核細胞を一過性に感染または形質転換してタンパク質を発現させるために、シミアンウイルス40（SV40）またはウシ乳頭腫ウイルスなどの真核生物ウイルスベクターを使用することである（例えば「Eukaryotic Viral Vectors」（コールドスプリングハーバー研究所、Gluzman編、1982）を参照されたい）。

10

【0078】

本発明が提供する微生物発現ポリペプチドまたはその断片の単離および精製は、分取用クロマトグラフィーや、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を使う免疫学的分離を含む従来の手段によって行なうことができる。

【0079】

本発明は、01-180、01-184または01-236ポリペプチドまたはその機能的断片と免疫反応する抗体を包含する。本質的にさまざまなエピトープ特異性を持つモノクローナル抗体がブールされてなる抗体ならびに個別のモノクローナル抗体が提供される。モノクローナル抗体は、当業者に周知の方法により、タンパク質の断片を含有する抗原から作製される（Kohlerら、Nature 256:495、1975）。本発明で使用する抗体という用語は完全な分子と、01-180、01-184または01-236上のエピトープ決定基を結合することができるその断片（例えばFabおよびF(ab')<sub>2</sub>など）とを包含するものとする。

20

【0080】

C. 診断用途

細胞変性障害という用語は卵巣中の任意のタイプの細胞の喪失を直接的または間接的に意味する。例えば、GDF-9の不在下では顆粒膜細胞の成長に障害があり、それが結果として卵母細胞の変性（すなわち死）につながる（Dongら、1996）。この卵母細胞の死は、顆粒膜細胞の分化をもたらすようである。また、GDF-9の不在下では、正常な莢膜細胞層が卵胞の周りに形成されない。したがって、1つの卵母細胞特異的タンパク質GDF-9が存在しないと、3種類の細胞系統、すなわち卵母細胞、顆粒膜細胞および莢膜細胞に欠損が生じる。同様にして、これらのさまざまな細胞系統の死または分化は、01-180、01-184または01-236の不在または不正発現による影響も受けるだろう。

30

【0081】

01-180、01-184または01-236の不在または不正発現は、卵母細胞/卵子に、卵子が精子による受精を受けることができなくなるような欠損をもたらすだろう。あるいは、これらの卵母細胞由来因子の不在に付随して、胚が発育しないか、胚形成の初期段階で発育を停止するか、または受精に欠損を示すかもしれない。したがって、01-180、01-184または01-236組成物は不妊全般の診断指標または予後指標として利用することができる。より具体的には、点突然変異、欠失、挿入または調節の乱れを同定することができる。本発明ではさらに、01-180、01-184または01-236発現レベルの変化を検出する、不妊の診断が考えられる。

40

【0082】

本発明の一態様は01-180、01-184または01-236発現の変化を検出する方法を含む。この方法は、発現した01-180、01-184または01-236のレベルを決定すること、または発現産物中の特異的改変を決定することを含みうる。特定の態様は、01-180、01-184または01-236の発現で変化が検出される。

【0083】

生物学的試料は組織または体液であることができる。さまざまな態様には精巣および卵巣

50

から得られる細胞が含まれる。他の態様には、腔液または精液などの体液試料が含まれる。

【0084】

使用する核酸は、標準的な方法論に従って (Sambrookら、1989)、生物学的試料に含まれる細胞から単離される。核酸はゲノムDNA、分画された細胞RNAまたは全細胞RNAであることができる。RNAを使用する場合は、RNAを相補的DNA (cDNA) に変換することが望ましいかもしれない。ある態様ではRNAは全細胞RNAであり、別の態様ではポリA RNAである。通常、核酸は増幅される。

【0085】

フォーマットに応じて、興味ある特定核酸は、試料中に、増幅を使って直接同定されるか、または増幅後に第2の既知核酸を使って同定される。次に、同定された産物を検出する。ある応用例では、この検出を視覚手段 (例えばゲルの臭化エチジウム染色) によって行うことができる。あるいは、検出には、化学発光、放射性標識または蛍光標識の放射線シンチグラフィによる、またさらには電気または熱インパルス信号を使ったシステムによる、産物の間接的同定が含まれる場合もある (Affymax Technology; Bellus、1994)。

【0086】

検出に続いて、与えられた患者に見られる結果を、正常患者および不妊と診断された患者の統計的に有意な基準群と比較することができる。

【0087】

01-180、01-184または01-236ポリヌクレオチド配列中の他の突然変異は、特定核酸中のヌクレオチド変化を検出することにより、本発明に従って同定することができると考えられる (参照により本明細書に組み込まれる米国特許第4,988,617号)。これに関して、例えば蛍光インサイチュハイブリダイゼーション (FISH; 米国特許第5,633,365号および米国特許第5,665,549号、それぞれ参照により本明細書に組み込まれる)、ダイレクトDNAシーケンシング、PFGE解析、サザンまたはノーザンブロット法、一本鎖コンフォメーション多型解析 (SSCA)、RNアーゼ保護アッセイ、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド (ASO、例えば米国特許第5,639,611号)、ドットブロット解析、変性勾配ゲル電気泳動 (例えば参照により本明細書に組み込まれる米国特許第5,190,856号)、RFLP (例えば参照により本明細書に組み込まれる米国特許第5,324,631号) およびPCR (登録商標) -SSCPなどを含めて、多種多様なアッセイが考えられる。例えば生物学的液体中の突然変異型遺伝子および癌遺伝子などの遺伝子配列を検出し、定量する方法は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第5,496,699号に記載されている。

【0088】

さらに、Haciaら (1996) およびShoemakerら (1996) に記載されているようなDNAチップ技術を不妊の診断に使用することもできると考えられる。簡単に述べると、これらの技術は、多数の遺伝子を迅速かつ正確に解析するための定量方法を含む。オリゴヌクレオチドで、または固定化されたプローブアレイを使って、遺伝子にタグを付けることにより、チップ技術を利用して、標的分子を高密度のアレイとして分離し、これらの分子をハイブリダイゼーションに基づいてスクリーニングすることができる。Peaseら (1994); Fodorら (1991) を参照されたい。

【0089】

ELISAおよびウェスタンブロット解析などの技術によって01-180、01-184または01-236含量を特徴づけるには、抗体を使用することができる。これは出生前スクリーニングまたは子供を欲しいと思っている人々のカウンセリングに役立つだろう。

【0090】

他にもさまざまな免疫検出方法のステップが、例えばNakamuraら (1987) などの科学文献に記載されている。免疫アッセイは、その最も簡単かつ直接的な意味で、結合アッセイである。好ましい免疫アッセイの一例は、さまざまなタイプのラジオイムノアッセイ (RIA) および免疫ビーズ捕捉アッセイである。組織切片を使用する免疫組織化学的検出も、とりわけ有用である。しかし、検出はそれらの技術に限定されるわけではなく、本発明には

10

20

30

40

50

ウェスタンブロット法、ドットブロット法、FACS解析なども使用しうることは、すぐに理解されるだろう。

【0091】

本発明の抗体は、多種多様な担体に結合させて、本発明のポリペプチドを含む抗原の存在を検出するために使用することができる。周知の担体の具体例にはガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ、天然および修飾セルロース、ポリアクリルアミド、アガロースおよび磁鉄鉱などがある。本発明の目的には、担体の性質は可溶性でも不溶性でもよい。当業者は抗体を結合するのに適した担体を他にも知っているか、または日常的な実験によってそれらを確認することができるだろう。

10

【0092】

当業者には多種多様な標識および標識法が知られている。本発明で使用する可以使用の標識のタイプの例には、酵素、放射性同位体、蛍光化合物、コロイド金属、化学発光化合物、燐光化合物および生物発光化合物などがある。当業者は抗体への結合に適した標識を他にも知っているか、または日常的な実験によってそれらを確認することができるだろう。

【0093】

同様に感度の向上をもたらすもう一つの技術は、抗体を低分子量ハプテンに結合することからなる。この場合、第二の反応を使って、これらのハプテンを特異的に検出することができる。例えばアビジンと反応するビオチンまたは特異的抗ハプテン抗体と反応することができるジニトロフェニル、プリドキサール (puridoxal) およびフルオレセインなどのハプテンを使用するのが一般的である。

20

【0094】

本発明のモノクローナル抗体を抗原のインビボ検出に使用する場合は、検出可能に標識された抗体を診断的に有効な用量で投与する。「診断的に有効な」という用語は、検出可能に標識されたモノクローナル抗体の量が、当該モノクローナル抗体が特異性を示す本発明のポリペプチドを構成する抗原を持つ部位の検出を可能とするのに十分な量で投与されることを意味する。投与される検出可能に標識されたモノクローナル抗体の濃度は、当該ポリペプチドを持つ細胞への結合がバックグラウンドと比較して検出可能になるような十分な濃度であるべきである。さらに、検出可能に標識されたモノクローナル抗体は、最適な標的対バックグラウンドシグナル比を得るために、循環系から迅速に除去されることが望ましい。一般に、インビボ診断用の検出可能に標識されたモノクローナル抗体の投与量は、その個体の年齢、性別および疾患の程度などといった因子に依存して変動するだろう。そのような投与量は、例えば、複数回の注射を行なうかどうか、抗原負荷量および当業者に知られている他の因子などに依存して変動しうる。

30

【0095】

インビボ画像診断法の場合は、利用できる検出装置のタイプが、与えられた放射性同位体を選択する際の重要な因子である。選択される放射性同位体の崩壊のタイプは、与えられた装置のタイプにとって検出可能なものでなければならない。インビボ診断用の放射性同位体を選択する際に重要なさらにもう一つの因子は、宿主に対して有害な放射線を最小限に抑えることである。インビボ画像法に使用される放射性同位体は、理想的には、粒子放射を伴わず、従来のガンマ線カメラで容易に検出することができる140~250keVの範囲の光子を数多く生成する。

40

【0096】

インビボ診断の場合、放射性同位体は免疫グロブリンに直接的に、または中間官能基を使って間接的に、結合させることができる。金属イオンとして存在する放射性同位体を免疫グロブリンに結合させるためによく使用される中間官能基は、例えばジエチレントリアミン五酢酸 (DTPA) およびエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) などの二官能性キレート剤である。本発明のモノクローナル抗体に結合させることができる金属イオンの典型例は、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{97}\text{Ru}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ 、 $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{72}\text{As}$ 、 $^{89}\text{Zr}$ および $^{201}\text{Ti}$ である。

50

## 【0097】

本発明のモノクローナル抗体は、磁気共鳴画像法（MRI）または電子スピン共鳴（ESR）で行なわれるようなインビボ診断のために、常磁性同位体で標識することもできる。一般に、従来の診断用画像可視化法は、どれでも使用することができる。通常、カメラ撮像にはガンマ線および陽電子放出放射性同位体を使用され、MRIには常磁性同位体を使用される。このような技術に特に有用な元素には、 $^{157}\text{Gd}$ 、 $^{55}\text{Mn}$ 、 $^{162}\text{Dy}$ 、 $^{55}\text{Cr}$ および $^{56}\text{Fe}$ がある。

## 【0098】

細胞増殖性障害という用語は、周囲の組織とは形態学的にも遺伝子型的にもしばしば異なっている見える悪性および非悪性細胞集団を意味する。アンチセンス分子である01-180、01-184および01-236ポリヌクレオチドは、さまざまな器官系（特に卵巣など）の悪性腫瘍を処置するのに役立つ。病因論的に01-180、01-184または01-236の発現の変化と関連する障害はいずれも、基本的には、それぞれ01-180、01-184または01-236抑制試薬による処置に感受性であると考えられることができるだろう。

10

## 【0099】

本発明は、卵巣の細胞増殖性障害を検出する方法であって、抗01-180、01-184または01-236抗体を、01-180、01-184または01-236関連障害を持つ疑いがある細胞と接触させ、その抗体への結合を検出することを含む方法を提供する。01-180、01-184または01-236と反応する抗体は、それぞれ01-180、01-184または01-236への結合の検出を可能にする化合物で標識される。本発明では、01-180、01-184または01-236ポリペプチドに特異的な抗体を使って、生物学的液体および組織中のそれぞれ01-180、01-184または01-236のレベルを検出することができる。検出可能な量の抗原を含有する標本はどれでも使用することができる。本発明の好ましい試料は、卵巣起源の組織、具体的には卵巣濾胞液または卵母細胞を含有する組織である。疑わしい細胞中の01-180、01-184または01-236のレベルを正常細胞中のレベルと比較することで、その検査対象が01-180、01-184または01-236関連細胞増殖性障害を持つかどうかを決定することができる。検査対象は好ましくはヒトである。本発明の抗体は、インビトロまたはインビボ免疫診断もしくは免疫療法を施すことが望ましい任意の対象で使用するすることができる。本発明の抗体は、例えば免疫アッセイでの使用に適しており、そのアッセイでは本発明の抗体を液相で、または固相担体に結合させた状態で、利用することができる。また、これらの免疫アッセイにおける抗体は、さまざまな方法で検出可能に標識することができる。本発明の抗体を利用することができる免疫アッセイのタイプの例は、直接または間接フォーマットの競合的および非競合的免疫アッセイである。そのような免疫アッセイの例にはラジオイムノアッセイ（RIA）とサンドイッチ（ELISA）アッセイがある。本発明の抗体を用いた抗原の検出は、正順、逆順または同時形式で実施される免疫アッセイ（生理学的試料に対する免疫組織化学的アッセイを含む）を使って行なうことができる。当業者は他の免疫アッセイフォーマットを知っているか、または甚だしい実験を行なわなくてもそれらを容易に識別することができる。

20

30

## 【0100】

## D. 治療用途

01-180、01-184および01-236は生殖管で発現するので、避妊、妊性および妊娠に関して、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチドおよび抗体を使ったさまざまな用途が存在する。01-180、01-184および01-236は月経周期の調節に関与するので、さまざまな避妊法に役立ちうる。

40

## 【0101】

また、01-180、01-184または01-236ポリヌクレオチド配列、ポリペプチド配列、抗体、その断片またはその突然変異体は、母性ゲノムを破損することによって初期胚形成を抑制または強化するために使用することもできると考えられる。胚発生で表現型を生じる母性ゲノムの破損は母性効果突然変異と呼ばれることが当業者には知られている。2つのそのような例が、ノックアウト技術を使ってマウスで特徴づけられている。どちらの例でも、遺伝子産物は成長する卵母細胞中に正常に蓄積され、初期発生胚でも持続し、その表現型はノックアウト雌の子孫に、その遺伝子型または性別とは無関係に、影響を及ぼす。最初に

50



同定された遺伝子は、MATER (maternal antigen that embryos require: 胚に必要な母性抗原) をコードしている。MATERは2細胞段階を超えた発生に必要であり、胚ゲノム転写パターンの確立に関連づけられている (Tongら、2000)。2番目に同定された遺伝子は、胚ゲノムで確立される刷込みパターンの維持および妊娠期間の最後の3分の1で发育中のマウスの成育性の維持に不可欠な卵母細胞特異的DNAメチルトランスフェラーゼDNMT1oをコードしている (Howellら、2001)。他の多くの卵母細胞由来因子も初期胚形成の複雑さをもたらすと思われ、したがって、01-180および01-236は母性効果遺伝子であると考えられる。というのも、これらは初期胚形成の過程で機能するからである。

#### 【0102】

さらなる態様として、01-236またはNPM2は、初期胚発生中のクロマチン再構築に関与しう  
ると考えられる。例えば、精子DNAの卵母細胞再構築に必要であり、卵核胞崩壊時に卵質  
中に放出される哺乳類核タンパク質の存在が、研究によって予測されている (Maedaら、1  
998)。さらに、卵母細胞は受精時の精子核だけでなく体細胞核も効率よく再構築できる  
ことが知られている。例えば本発明者らは、核移植クローニングにおけるNPM2の役割を考  
察した (Zuccottiら、2000)。(01-236がコードする)NPM2は、初期胚発生中のクロマチ  
ン再構築にとって不可欠な哺乳類卵母細胞中の因子であると予想される。したがって、除  
核卵母細胞にNPM2を補うことにより、核移植技術によるクローニングが容易になるだろ  
う。

10

#### 【0103】

本発明のモノクローナル抗体は、検査対象における01-180、01-184または01-236関連疾患  
の改善の推移をモニターするためにインビトロおよびインビボで 사용할 ことができる。  
したがって、例えば本発明のポリペプチドを含む抗原を発現させる細胞の数の増加もしく  
は減少またはさまざまな体液中に存在するそのような抗原の濃度の変化を測定することに  
より、01-180、01-184または01-236関連疾患の改善を目的とする特定の治療的措置が有効  
かどうかを決定することができるだろう。改善という用語は、治療を受けている検査対象  
における01-180、01-184または01-236関連疾患の有害作用の減少を意味する。

20

#### 【0104】

本発明により、正常細胞における発現とは違う形で発現されうるヌクレオチド配列が同定  
されるので、この配列に対して適切な治療技術または診断技術を設計することができる。  
例えば、細胞増殖性障害が01-180、01-184または01-236の発現と関係する場合は、それぞ  
れ01-180、01-184または01-236の発現を翻訳レベルで妨害する核酸配列を使用することが  
できる。このアプローチでは、例えばアンチセンス核酸またはリボザイムを使用して、特  
定の01-180、01-184または01-236 mRNAをアンチセンス核酸で遮蔽するか、リボザイムで  
それを切断することによって、当該mRNAの翻訳を阻止する。

30

#### 【0105】

アンチセンス核酸は、特定のmRNA分子の少なくとも一部に相補的なDNAまたはRNA分子であ  
る (Weintraub、1990)。細胞内でアンチセンス核酸は対応するmRNAにハイブリダイズし  
て二本鎖分子を形成する。細胞は二本鎖であるmRNAを翻訳しないだろうから、アンチセン  
ス核酸はmRNAの翻訳を妨害する。約15ヌクレオチドのアンチセンスオリゴマーが好ましい  
。というのも、それらは合成が容易であり、また標的とする01-180、01-184または01-236  
産生細胞に導入する時に、これより大きい分子と比べて問題を生じる可能性が低いからで  
ある。アンチセンス法を使った遺伝子のインビトロ翻訳の阻害は当技術分野ではよく知ら  
れている (Marcus-Sakura、1988)。

40

#### 【0106】

リボザイムは、DNA制限エンドヌクレアーゼに似た様式で他の一本鎖RNAを特異的に切断す  
る能力を持つRNA分子である。これらのRNAをコードするヌクレオチド配列の改変により、  
RNA分子中の特定のヌクレオチド配列を認識しそれを切断する分子を設計することができ  
る (Cech、1988)。このアプローチの大きな利点は、それらが配列特異的であるために、  
特定の配列を持つmRNAだけが不活化されることである。

#### 【0107】

50

リボザイムには2つの基本型、すなわちテトラヒメナ型 (Hasselhoff, 1988) と「ハンマーヘッド」型がある。テトラヒメナ型リボザイムは4塩基長の配列を認識し、「ハンマーヘッド」型リボザイムは11~18塩基長の塩基配列を認識する。認識配列が長いほど、その配列がもっぱら標的mRNA種だけに存在する可能性は高くなる。そのため、特定のmRNA種を不活化するにはテトラヒメナ型リボザイムよりハンマーヘッド型リボザイムの方が好ましく、18塩基長認識配列は、それより短い認識配列よりも好ましい。

#### 【0108】

本発明は、01-180、01-184または01-236タンパク質が媒介する細胞増殖性障害または細胞変性障害を処置するための遺伝子治療も提供する。そのような治療法は、各01-180、01-184もしくは01-236 cDNAまたは01-180、01-184もしくは01-236アンチセンスポリヌクレオチドを、増殖性障害または変性障害をもつ細胞に導入することによって、その治療効果を達成するだろう。01-180、01-184もしくは01-236 cDNAまたはアンチセンス01-180、01-184もしくは01-236ポリヌクレオチドの送達は、キメラウイルスなどの組換え発現ベクターまたはコロイド分散系を使って達成することができる。標的指向型リボソームの使用は、cDNAまたはアンチセンス配列の治療的送達にはとりわけ好ましい。

10

#### 【0109】

ここに教示する遺伝子治療に利用することができるさまざまなウイルスベクターには、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニア、また好ましくは、レトロウイルスなどのRNAウイルスが含まれる。レトロウイルスベクターは、好ましくは、ネズミレトロウイルスまたは鳥類レトロウイルスの誘導體である。単一の外来遺伝子を挿入することができるレトロウイルスベクターの例には、モロニー Maus 白血病ウイルス (MoMuLV)、ハーベイ Maus 肉腫ウイルス (HaMuSV)、Maus 乳癌ウイルス (MuMTV) およびラウス肉腫ウイルス (RSV) があるが、これらに限るわけではない。他のいくつかのレトロウイルスベクターは複数の遺伝子を組み込むことができる。これらのベクターはすべて、形質導入細胞を同定し作出することができるように、選択可能マーカーの遺伝子を伝達するまたは組み込むことができる。目的の01-180、01-184または01-236配列を、例えば特定標的細胞上のレセプターのリガンドをコードするもう一つの遺伝子と共にウイルスベクターに挿入することにより、そのベクターは標的特異的になる。レトロウイルスベクターは、例えば糖、糖脂質またはタンパク質をコードするポリヌクレオチドを挿入することによって標的特異的にすることができる。好ましいターゲティングは、抗体を使ってレトロウイルスベクターを標的に誘導することによって達成される。当業者は、01-180、01-184もしくは01-236 cDNAまたは01-180、01-184もしくは01-236アンチセンスポリヌクレオチドを含有するレトロウイルスベクターの標的特異的な送達が可能になるようにレトロウイルスゲノムに挿入することができる特別なポリヌクレオチド配列を知っているか、または甚だしい実験を行わずにそれらをすぐに確認することができる。

20

30

#### 【0110】

組換えレトロウイルスは欠損性なので、それらが感染性ベクター粒子を産生するには補助が必要である。この補助は、例えばLTR内の調節配列の制御下にレトロウイルスの構造遺伝子のすべてをコードしているプラスミドを含有するヘルパー細胞系を使用することによって提供することができる。これらのプラスミドは、パッキング機構がキャプシド形成のためにRNA転写物を認識できるようにするヌクレオチド配列を欠いている。パッケージングシグナルが欠失しているヘルパー細胞系には、例えば 2、PA317およびPA12などがあるが、これらに限るわけではない。これらの細胞系はゲノムがパッケージされないので空のウイルス粒子を産生する。そのような細胞に、パッケージングシグナルは完全であるが構造遺伝子が目的とする他の遺伝子で置換されているレトロウイルスベクターを導入すると、そのベクターはパッケージングされ、ベクターウイルス粒子の産生が可能になる。

40

#### 【0111】

もう一つの選択肢として、NIH3T3または他の組織培養細胞にレトロウイルス構造遺伝子 gag、polおよびenvをコードするプラスミドを従来のリン酸カルシウムトランスフェクションによって直接トランスフェクトすることもできる。次に、これらの細胞に目的の遺伝子

50

を含有するベクタープラスミドをトランスフェクトする。その結果得られる細胞は培養培地中にレトロウイルスベクターを放出する。

#### 【0112】

01-180、01-184もしくは01-236 cDNAまたは01-180、01-184もしくは01-236アンチセンスポリヌクレオチド用のもう一つの標的指向型送達系はコロイド分散系である。コロイド分散系には、高分子複合体、ナノカプセル複合体、ナノカプセル、マイクロスフェア、ビーズ、ならびに油中水型エマルション、ミセル、混合ミセルおよびリポソームなどの脂質に基づく系が包含される。本発明の好ましいコロイド系はリポソームである。リポソームは、インビトロおよびインビボで送達媒体として役立つ人工膜小胞である。サイズが0.2~4.0mmの範囲の大きい単層小胞 (large unilamellar vesicle; LUV) には、大きい高分子を含有する水性緩衝液をかなりのパーセンテージまで封入することができる。RNA、DNAおよび完全なウイルス粒子を水性の内部に封入して、生物学的に活性な形で細胞に送達することができる (Fraleyら、1981)。リポソームは、哺乳類細胞だけでなく、植物、酵母および細菌細胞でもポリヌクレオチドの送達に使用されている。リポソームが効率のよい遺伝子導入媒体であるためには、以下の特徴を持つべきである：(1) 目的の遺伝子が、その生物学的活性を損なわれることなく、高い効率で封入されること、(2) 非標的細胞と比較して標的細胞に優先的かつ強固に結合すること、(3) 小胞の水性内容物を標的細胞細胞質に高い効率で送達すること、および(4) 遺伝情報の正確かつ効果的な発現 (Manningら、1988)。

10

#### 【0113】

リポソームの組成は、リン脂質 (特に高相転移温度リン脂質) と通常はステロイド (特にコレステロール) との組み合わせであることが普通である。他のリン脂質または他の脂質も使用できる。リポソームの物理特性はpH、イオン強度および二価カチオンの存在に依存する。

20

#### 【0114】

リポソームの製造に役立つ脂質の例には、ホスファチジル化合物、例えばホスファチジルグリセロール、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルエタノールアミン、スフィンゴ脂質、セレブロシドおよびガングリオシドなどがある。脂質部分が14~18個の炭素原子、好ましくは16~18個の炭素原子を含み飽和しているジアシルホスファチジルグリセロールは特に有用である。リン脂質の一例として、卵ホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリンおよびジステアロイルホスファチジルコリンが挙げられる。

30

#### 【0115】

リポソームのターゲティングは解剖学的因子と機構的因子に基づいて分類することができる。解剖学的分類は選択性のレベルに基づくものであり、例えば器官特異的、細胞特異的および細胞小器官特異的などである。機構面ではターゲティングはそれが受動的であるか能動的であるかに基づいて識別することができる。受動的ターゲティングでは、洞様毛細血管を含む器官内の細網内皮系 (RES) の細胞に分布するというリポソームが自然に持っている傾向を利用する。一方、能動的ターゲティングでは、自然に起こる局在化の部位以外の器官および細胞タイプへのターゲティングが達成されるように、リポソームをモノクローナル抗体、糖、糖脂質またはタンパク質などの特異的リガンドに結合するか、リポソームの組成またはサイズを変えることによって、リポソームの改変を行なう。

40

#### 【0116】

標的指向型送達系の表面はさまざまな方法で修飾することができる。リポソーム標的指向型送達系の場合は、ターゲティングリガンドをリポソーム二重層と安定に会合させておくために、脂質基をリポソームの脂質二重層に組み込むことができる。ターゲティングリガンドへの脂質鎖の結合には、さまざまな連結基を使用することができる。

#### 【0117】

E. モジュレーターのスクリーニング

本発明では、01-180、01-184または01-236を刺激するか、01-180、01-184または01-236の

50

欠如を克服するか、01-180、01-184または01-236分子の作用を遮断または阻害する活性を持つ化合物のスクリーニングに、01-180、01-184または01-236および活性断片、ならびにそれらをコードする核酸を使用することも考えられる。これらのアッセイは多種多様なフォーマットを利用して行うことができ、そのスクリーニングが目的としている「活性」の種類に依存しうる。

#### 【0118】

ある態様では、01-180、01-184もしくは01-236ポリペプチドまたはその断片に結合する化合物のスクリーニングに、本発明を応用する。ポリペプチドまたは断片は溶解状態で遊離しているか、支持体に固定されているか、細胞中または細胞の表面上に発現しているか。ポリペプチド側または化合物側を標識して、結合を検出できるようにすることができる。

10

#### 【0119】

もう一つの態様として、アッセイでは、天然または人工の基質または結合パートナーに対する01-180、01-184または01-236の結合の阻害を測定することができる。薬剤の1つ（01-180、01-184または01-236、結合パートナーまたは化合物）を標識する競合結合アッセイを行うことができる。通常はポリペプチドが標識分子種になる。遊離標識の量を結合している標識の量とを対比して測定することにより、結合または結合の阻害を決定することができる。

#### 【0120】

化合物のハイスループットスクリーニングを行うためのもう一つの技術は、W084/03564に記載されている。多数の小ペプチド試験化合物をプラスチックピンなどの固体基盤または他の何らかの表面上に合成する。ペプチド試験化合物を01-180、01-184または01-236と反応させ、洗浄する。結合したポリペプチドをさまざまな方法で検出する。

20

#### 【0121】

精製された01-180、01-184または01-236は、上述の薬物スクリーニング技術で使用するために、プレート上に直接コーティングすることができる。しかし、ポリペプチドに対する非中和抗体を使って、固相にポリペプチドを固定化することもできる。また、反応性領域（好ましくは末端領域）を含む融合タンパク質を使って、01-180、01-184または01-236活性領域を固相に連結してもよい。

#### 【0122】

01-180、01-184または01-236遺伝子中に自然突然変異もしくは人工突然変異または野生型を含むさまざまな細胞株を使って、01-180、01-184または01-236のさまざまな機能的特性を研究し、候補化合物がこれらの特性にどのように影響を及ぼすかを研究することができる。突然変異を人工的に作る方法は、本明細書の他の項で説明する。また、01-180、01-184または01-236中に生じて不妊につながる、不妊の一因となる、そして/または他の形で不妊を引き起こす自然突然変異も、本明細書の他の項で説明する。アッセイでは、化合物の生化学的性質を考慮して、化合物を適当に調合し、標的細胞と接触させる。アッセイによっては培養が必要な場合もある。次に、多種多様な生理学的アッセイに基づいて細胞を調べることができる。あるいは、01-180、01-184もしくは01-236または関連経路の機能を探ることができるような分子解析を行ってもよい。

30

40

#### 【0123】

具体的態様として、当技術分野で標準的な手段により、本発明のポリペプチド、すなわち01-180、01-184または01-236を使って、酵母ツーハイブリッド解析を行う。ツーハイブリッドスクリーニングは、あるタンパク質の機能を、そのタンパク質と相互作用する他のタンパク質を同定することによって、解明するためまたは特徴づけるために使用される。機能がわかっていないタンパク質（ここではこれを「ベイト (bait)」という）を、GAL4のDNA結合ドメインをも含んでいるキメラタンパク質として製造する。このキメラタンパク質を発現させるヌクレオチド配列を含むプラスミドで酵母細胞を形質転換する。この酵母細胞は、さまざまな候補標的タンパク質をコードするさまざまなヌクレオチド配列に融合されたGAL4活性化ドメインを含むライブラリーに由来する代表プラスミドも含む。もし

50

ベイトタンパク質が標的タンパク質と物理的に相互作用するのであれば、GAL4活性化ドメインとGAL4 DNA結合ドメインとがつながれ、その結果、共同的に作用してレポーター遺伝子の転写を促進することができるようになる。ベイトタンパク質と、ある細胞中の候補標的タンパク質との間に相互作用が起こらない場合は、GAL4成分は離れたままであり、レポーター遺伝子の転写を単独では促進することができない。b-ガラクトシダーゼ、HIS3、ADE2またはURA3を含めて、さまざまなレポーター遺伝子を利用できることが、当業者には知られている。また、GAL4成分の相互作用（したがって特定ベイトと標的タンパク質との相互作用）を示すために、複数のレポーター配列をそれぞれ異なる誘導性プロモーターの制御下に置いて、同じ細胞内で利用することもできる。複数のレポーター配列を使用すれば偽陽性候補を取得する可能性が下がることが、当業者には知られている。また、LexAなどの代替DNA結合ドメイン/活性化ドメイン成分を使用することもできる。レポーター遺伝子のトランス活性化をもたらすことができる限り、任意の活性化ドメインを任意のDNA結合ドメインと組み合わせることが、当業者には知られている。さらに、LexAシステムの場合と同様に、2つの成分のどちらか一方は、他方の成分が存在してそれらが共同してレポーター遺伝子のトランス活性化を可能にする限り、原核生物由来であってもよいことも、当業者には知られている。

10

#### 【0124】

ツーハイブリッド実験の試薬類および設計は、このシステムの最新の改良版（Fashenaら、2000）を含めて、当業者にはよく知られている（P. L. BartelおよびS. Fields編「The Yeast Two-Hybrid System」オックスフォード大学出版局、1997）。当業者には、Clontech（カリフォルニア州パロアルト）製のMatchmaker（登録商標）システムやHybriZAP（登録商標）2.1ツーハイブリッドシステム（Stratagene；カリフォルニア州ラホーヤ）などの市販のベクター、または研究コミュニティを通して入手できるベクター（Yangら、1995；Jamesら、1996）が知られている。これに代わる態様では、哺乳類（Stratagene（カリフォルニア州ラホーヤ）製の哺乳類ツーハイブリッドアッセイキット）または大腸菌（Huら、2000）などの、酵母以外の生物がツーハイブリッド解析に使用される。

20

#### 【0125】

ある代替態様では、細胞質ベースのアッセイでタンパク質-タンパク質相互作用を検出するツーハイブリッドシステムが利用される。この態様では、タンパク質を細胞質で発現させることにより、翻訳後修飾が起こるようにし、また転写活性化因子および転写阻害因子をベイトとしてスクリーニングに使用することができるようにする。そのような系の一例は、Stratagene（カリフォルニア州ラホーヤ）のCytoTrap（登録商標）ツーハイブリッドシステムであり、このシステムでは、hSos（グアニンヌクレオチド交換因子）の酵母ホモログであるcdc25遺伝子に温度感受性突然変異を持つ酵母の細胞膜に標的タンパク質が固定されることになる。ベイトタンパク質が標的に結合すると、hSosが膜に局在化し、GDP/GTP交換を促進することによるRASの活性化が可能になる。次にRASは、突然変異型酵母cdc25Hの377での生育を可能にするシグナリングカスケードを活性化する。このシステムのためのベクター（pMyrおよびpSosなど）およびこのシステムに関する他の実験詳細は、Stratagene（カリフォルニア州ラホーヤ）から入手することができる（例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第5,776,689号も参照されたい）。

30

40

#### 【0126】

したがって、本発明のある態様によれば、01-180、01-184または01-236と相互作用するペプチドのスクリーニング方法であって、試験ペプチド（この試験ペプチドはDNA結合ドメインに融合されている）をコードするDNAセグメントを含む第1核酸と、01-180、01-184または01-236の少なくとも一部（この01-180、01-184または01-236の少なくとも一部はDNA活性化ドメインに融合されている）をコードするDNAセグメントを含む第2核酸とを、細胞に導入することを含む方法が提供される。次に、DNA結合ドメインとDNA活性化ドメインとの相互作用をアッセイすることによって、試験ペプチドと01-180、01-184もしくは01-236ポリペプチドまたはその断片との相互作用に関するアッセイを行う。例えば、DNA結合ドメインと活性化ドメインとの相互作用のアッセイは、b-ガラクトシダーゼ発現の活性化で

50

あることができる。

【0127】

一つの代替方法は、組換え01-180、01-184または01-236によるl.gt11、l.LZAP (Stratagene) またはこれに等価なcDNA発現ライブラリーのスクリーニングである。組換え01-180、01-184もしくは01-236またはその断片は、FLAG、HSVまたはGSTなどの小さいペプチドタグに融合される。これらのペプチドタグは、便利なキナーゼ (心筋クレアチンキナーゼなど) リン酸化部位を持つことができ、あるいはビオチン化することができる。組換え01-180、01-184または01-236は、<sup>32</sup>[P]でリン酸化するか、または標識せずに使用して、ストレプトアビジンまたはタグに対する抗体で検出することができる。l.gt11 cDNA発現ライブラリーを興味ある細胞から作製し、組換え01-180、01-184または01-236と共にインキュベートし、洗浄し、01-180、01-184または01-236と相互作用するcDNAクローンを単離する。当業者はこのような方法を日常的に使用している。例えばSambrookの前掲書を参照されたい。

10

【0128】

もう一つの方法は、cDNAをベクター中の哺乳類プロモーターとポリアデニル化部位の間にクローニングし、それを細胞に一過性にトランスフェクトする、哺乳類発現ライブラリーのスクリーニングである。48時間後に、固定洗浄した細胞を標識01-180、01-184または01-236と共にインキュベートすることによって、結合タンパク質を検出する。このようにして、目的の結合タンパク質をコードするcDNAを含むcDNAのプールを選択し、各プローブをさらに細分し、一過性トランスフェクション、結合およびオートラジオグラフィーのサイクルを繰り返すことによって、目的のcDNAを単離することができる。あるいは、cDNAライブラリー全体を哺乳類細胞にトランスフェクトし、それらの細胞を、プレートに結合させた01-180、01-184または01-236を含むディッシュ上でパンニングすることによって、目的のcDNAを単離することもできる。洗浄後に付着している細胞を溶解し、プラスミドDNAを単離し、細菌内で増幅し、トランスフェクションとパンニングのサイクルを、単一のcDNAクローンが得られるまで繰り返す。参照により本明細書に組み込まれるSeedら (1987) およびAruffoら (1987) を参照されたい。結合タンパク質が分泌される場合は、一過性トランスフェクト細胞から得られる上清をアッセイするための結合アッセイまたは中和アッセイがいったん確立されれば、同様のプール戦略によって、そのcDNAを取得することができる。上清をスクリーニングするための一般的方法はWongら (1985) に開示されている。

20

30

【0129】

もう一つの代替方法は、01-180、01-184および01-236と相互作用するタンパク質を細胞からの直接単離することである。01-180、01-184または01-236とGSTまたは小ペプチドタグとの融合タンパク質を作製し、ビーズに固定化する。興味ある細胞から、生合成的に標識されたタンパク質または標識されていないタンパク質抽出物を調製し、前記ビーズと共にインキュベートし、緩衝液で洗浄する。01-180、01-184または01-236と相互作用するタンパク質をビーズから特異的に溶離させ、SDS-PAGEで解析する。結合パートナー一次アミノ酸配列データをマイクロシーケンシングによって得る。所望により、細胞タンパク質のチロシンリン酸化などといった機能的応答を誘発する薬剤で細胞を処理することもできる。そのような薬剤の一例は成長因子または、インターロイキン2などのサイトカインだろう。

40

【0130】

もう一つの代替方法は免疫アフィニティー精製である。組換え01-180、01-184または01-236を標識細胞抽出物または非標識細胞抽出物と共にインキュベートし、抗01-180、01-184または01-236抗体で免疫沈降させる。免疫沈降物をプロテインA-セファロースで回収し、SDS-PAGEで解析する。非標識タンパク質はビオチン化によって標識され、ストレプトアビジンを使ってSDSゲル上で検出される。結合パートナータンパク質をマイクロシーケンシングによって解析する。さらに、マイクロシーケンシングに先立って、当業者に知られている標準的な生化学精製ステップを使用してもよい。

【0131】

50

さらにもう一つの代替方法は、結合パートナーに関するペプチドライブラリーのスクリーニングである。タグ付きのまたは標識した組換え01-180、01-184または01-236を使って、ペプチドライブラリーまたはホスホペプチドライブラリーから、01-180、01-184または01-236と相互作用するペプチドを選択する。ペプチドのシークエンシングは、相互作用するタンパク質に見いだされるかもしれない共通ペプチド配列の同定につながる。

#### 【0132】

本発明はさまざまな動物モデルの使用も包含する。例えば、ヒト01-180、01-184または01-236と他の動物01-180、01-184または01-236の間に認められる一致はいずれも、それが正常に発現される丸ごとの動物系での01-180、01-184または01-236の機能を調べる格好の機会になる。正常な01-180、01-184または01-236を発現させることができない突然変異型細胞系を開発または単離することにより、マウスに、卵形成および胚発生における01-180、01-184または01-236の機序およびその役割の研究を可能にするモデルを作出することができる。

10

#### 【0133】

試験化合物による動物の処置には、化合物を適当な形態で動物に投与することが含まれるだろう。投与は、例えば経口、鼻腔、口腔、直腸、腔内または局所経路など、臨床目的または非臨床目的に利用することができる任意の経路で行われるだろう。あるいは、投与は、気管内点滴、気管支点滴、皮内、皮下、筋肉内、腹腔内または静脈内注射によって行うこともできる。特に、全身的静脈内注射、血液供給またはリンパ供給を介した局部的投与および腫瘍内注射が考えられる。

20

#### 【0134】

ある化合物のインビボでの有効性の決定には多種多様な基準が含まれる。そのような基準には、例えば妊性の向上、妊性の減少または避妊が含まれる。

#### 【0135】

本発明の一態様では、機能的01-180、01-184もしくは01-236ポリペプチドまたはその変異体をコードする機能的導入遺伝子を含むトランスジェニック動物が作出される。01-180、01-184または01-236導入遺伝子が発現させるトランスジェニック動物、そのような動物から得られる組換え細胞系、およびトランスジェニック胚は、01-180、01-184または01-236の機能を誘導または抑制する薬剤のスクリーニングを行って、そのような薬剤を同定する方法に役立つ。本発明のトランスジェニック動物は、疾患状態を研究するためのモデルとして使用することもできる。

30

#### 【0136】

本発明の一態様では、01-180、01-184または01-236導入遺伝子を非ヒト宿主に導入して、01-180、01-184または01-236を発現させるトランスジェニック動物を作出する。本トランスジェニック動物は、導入遺伝子が発現できるような形でゲノムに導入遺伝子を組み込むことによって作出される。トランスジェニック動物の作出方法は、WagnerおよびHoppe（米国特許第4,873,191号；この特許は参照により本明細書に組み込まれる）、Brinsterら、1985（この文献は参照によりその全文が本明細書に組み込まれる）ならびにHogan, Beddington, CostantiniおよびLong「Manipulating the Mouse Embryo; A Laboratory Manual」第2版（Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994；この文献は参照によりその全文が本明細書に組み込まれる）に概説されている。

40

#### 【0137】

導入遺伝子と内在性遺伝子との相同組換えによって内在性01-180、01-184または01-236を置き換えることが望ましいだろう。あるいは、「ノックアウト」動物を作出する場合のように、欠失によって内在性遺伝子を除去することもできる。典型的には、興味ある遺伝子の一部と選択マーカーとを含むターゲティングベクターを作製し、胚性幹（ES）細胞にトランスフェクトする。これらのターゲティングベクターは、hprt陰性ES細胞系にエレクトロポレートされ、HATおよびFIAU中で選択される。正しい突然変異を持つES細胞を胚盤胞に注入して、突然変異型01-180、01-184および01-236遺伝子に関するキメラを作出し、最終的にはヘテロ接合体およびホモ接合体を作出する。例えば「ノックアウト」マウスには

50

01-180、01-184または01-236が存在しないことを利用して、01-180、01-184または01-236タンパク質の喪失がインビボで細胞に及ぼす影響を研究することができる。

【0138】

上述のように、トランスジェニック動物およびそのような動物に由来する細胞系は、ある種の検証実験に役立ちうる。この場合、野生型または突然変異型01-180、01-184または01-236を発現させる能力を持つトランスジェニック動物および細胞系を、試験物質に暴露することができる。野生型01-180、01-184または01-236発現および/または機能を強化する能力または突然変異型01-180、01-184または01-236の発現または機能を損なう能力に関して、これらの試験物質をスクリーニングすることができる。

【0139】

F. 患者に投与するための製剤および経路

臨床的用途が考えられる場合は、意図する用途に適した形態の医薬組成物（発現ベクター、ウイルスストック、タンパク質、抗体および薬物）を製造する必要があるだろう。一般に、これには、発熱物質およびヒトまたは動物に対して有害であるかもしれない他の不純物を基本的に含まない組成物の製造が必要だろう。

【0140】

一般的には、送達ベクターを安定化し、標的細胞による取り込みを可能にするために、適当な塩類および緩衝液を使用することが望まれるだろう。緩衝液は、組換え細胞を患者に導入する場合にも使用されるだろう。本発明の水性組成物は、薬学的に許容できる担体または水性媒質に溶解または分散された有効量の細胞向けベクターを含む。そのような組成物は接種材料とも呼ばれる。「薬学的または薬理学的に許容できる」という表現は、動物またはヒトに投与したときに有害反応、アレルギー反応または他の不都合な反応を引き起こさない分子の実体および組成物を指す。本明細書にいう「薬学的に許容できる担体」は、ありとあらゆる溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤、抗真菌剤、浸透圧調節剤、吸収遅延剤などを包含する。医薬活性物質へのそのような媒質および薬剤の使用は、当技術分野ではよく知られている。通常の媒質または薬剤は、それが本発明のベクターまたは細胞と適合しない場合を除き、治療用組成物への使用が考えられる。組成物には追加活性成分も組み込むことができる。

【0141】

本発明の活性組成物には、古典的医薬調製物を含めることができる。これら本発明組成物の投与には、どの一般的経路であっても、その経路で標的組織に到達することができる限り、使用することができる。これには経口、鼻腔、口腔、直腸、腔内および局所経路が含まれる。あるいは、投与は、同所性、経皮、皮下、筋肉内、腹腔内または静脈内注射によって行うこともできる。そのような組成物は、通常は上述の薬学的に許容できる組成物として投与されるだろう。

【0142】

活性化合物は、非経口投与または腹腔内投与することもできる。遊離塩基または薬理学的に許容できる塩としての活性化合物の溶液は、ヒドロキシプロピルセルロースなどの界面活性剤と適切に混合した水中に調製することができる。分散液をグリセロール、液体ポリエチレングリコール、およびその混合物中、ならびに油中に調製することもできる。通常の貯蔵および使用条件では、これらの調製物は微生物の成長を防止するために保存剤を含む。

【0143】

注射用途に適した医薬形態には、滅菌水溶液または滅菌水性分散液、および滅菌注射用溶液または滅菌注射用分散液の即時調合用の滅菌粉末が含まれる。いずれの場合も、剤形は滅菌されていなければならない、容易に注射器を通過する程度に流動性でなければならない。また、製造および貯蔵条件下で安定でなければならない、細菌および真菌などの微生物の汚染作用に対して保護されなければならない。担体は、例えば水、エタノール、ポリオール（例えばグリセロール、プロピレングリコールおよび液体ポリエチレングリコールなど）、その適当な混合物、および植物油などを含む溶媒または分散媒であることができる。

10

20

30

40

50



適正な流動性は、例えばレシチンなどのコーティングの使用によって、分散系の場合には必要な粒径の維持によって、また界面活性剤の使用によって維持することができる。微生物の作用の防止は、さまざまな抗細菌剤および抗真菌剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサルなどによって実現することができる。多くの場合、浸透圧調節剤、例えば糖または塩化ナトリウムなどを含めることが好ましいだろう。注射用組成物の持続的吸収は、吸収を遅延させる薬剤、例えばモノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンなどを組成物中に使用することによって達成することができる。

#### 【0144】

滅菌注射用溶液は、必要量の活性化合物を、適当な溶媒中で、上に列挙した他のさまざまな成分と必要量で混合した後、濾過滅菌することによって調製される。一般に、分散液は、基礎分散媒と上に列挙したものから選択される他の必要な成分とを含む滅菌ビヒクルにさまざまな滅菌活性成分を混合することによって調製される。滅菌注射用溶液を調製するための滅菌粉末の場合、好ましい製造方法は、真空乾燥および凍結乾燥技術であり、これにより、活性成分 + 先に滅菌濾過したその溶液に由来する所望の追加成分の粉末が得られる。

10

#### 【0145】

本明細書にいう「薬学的に許容できる担体」は、ありとあらゆる溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤、抗真菌剤、浸透圧調節剤、吸収遅延剤などを包含する。医薬活性物質へのそのような媒質および薬剤の使用は、当技術分野ではよく知られている。通常の媒質または薬剤は、それが本発明の活性成分と適合しない場合を除き、治療用組成物への使用が考えられる。組成物には追加活性成分も組み込むことができる。

20

#### 【0146】

経口投与の場合、本発明のポリペプチドを賦形剤と混合し、非摂取用含嗽剤および歯磨剤の形で試用することができる。含嗽剤は必要量の活性成分を適当な溶媒、例えばホウ酸ナトリウム溶液（ドーベル液）などに混合することによって製造することができる。あるいは、ホウ酸ナトリウム、グリセリンおよび重炭酸カリウムを含む殺菌洗浄剤に活性成分を組み込むこともできる。活性成分は、ゲル剤、ペースト剤、粉末剤およびスラリー剤を含む歯磨剤に分散させてもよい。水、結合剤、研磨材、着香剤、起泡剤および湿潤剤を含みうる練り歯磨き剤に、治療有効量の活性成分を加えることができる。

#### 【0147】

本発明の組成物は、中性または塩の形で処方することができる。薬学的に許容できる塩には、酸付加塩（タンパク質の遊離のアミノ基を使って形成されるもの）が含まれ、これらは例えば塩酸またはリン酸などの無機酸、または酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸などの有機酸を使って形成される。遊離のカルボキシル基を使って形成される塩も、例えば水酸化ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウムまたは第二鉄などの無機塩基、およびイソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、プロカインなどの有機塩基から誘導することができる。

30

#### 【0148】

製剤化が終わったら、溶液剤は、その剤形に適した方法で、治療的に有効であるような量で投与されるだろう。製剤は、注射用溶液、薬物放出カプセルなどのさまざまな剤形で、容易に投与される。例えば、水性溶液剤として非経口投与する場合は、溶液が必要に応じて適切に緩衝化されているべきであり、希釈液をまず十分量の食塩水またはグルコースで等張性になるようにする。これらの特定の水溶液は静脈内、筋肉内、皮下および腹腔内投与にとりわけ適している。これに関して、使用することができる滅菌水性媒質は、本明細書の内容を考慮すれば、当業者にはわかるだろう。例えば、1回量を1mlの等張性NaCl溶液に溶解し、それを1000mlの皮下注入液に加えるか、注入しようとする部位に注射する（例えば「Remington's Pharmaceutical Sciences」第15版の1035～1038頁および1570～1580頁を参照されたい）。処置対象の状態に応じて投与量には必然的にある程度の変動が生じるだろう。いずれにせよ、投薬責任者は個々の対象に適した用量を決定することになる。さらに、ヒト投与の場合、調製物は、FDA生物製剤局の基準が要求する滅菌性、発熱原性

40

50

、一般的安全性および純度の基準を満たすべきである。

【0149】

G. 実施例

本発明の好ましい態様を例示するために、以下に実施例を記載する。以下の実施例に開示する技術は、本発明者らが本発明の実施に際してうまく機能することを見いだした技術を表し、したがってその実施の好ましい形態を構成するとみなすことができるということは、当業者には理解されるはずである。しかし、ここに開示する具体例には数多くの変更を加えることができ、それでもなお本発明の精神および範囲から逸脱することなく、よく似たまたは同類の結果が得られることは、本明細書の開示に照らして、当業者には理解されるだろう。

10

【実施例1】

【0150】

cDNAサブトラクティブハイブリダイゼーションライブラリーの作製

Gdf9ノックアウトマウスの卵巢は、卵胞形成の初期障害により、野生型の卵巢とは組織学的に著しく異なる。特に、Gdf9ノックアウト卵巢では単層一次卵胞が比較的豊富で、卵母細胞喪失後に異常卵胞巣が形成される。本発明者らは、Gdf9ノックアウト卵巢でアップレギュレートされる新規卵巢発現転写物をクローニングするために、卵巢組成のこれらの相違を利用し、それらを遺伝子発現パターンの変化と関連付けた。

【0151】

Gdf9ノックアウトマウス(C57BL/6/129SvEv雑種)または野生型マウスから卵巢を集め、各プールからポリA+ mRNAを調製した。本発明者らは、CLONTECH PCR-Selectサブトラクションキットの変法を使って、Gdf9ノックアウト卵巢中でアップレギュレートされる配列が濃縮されていると予想されるpBluescript SK+プラスミド型cDNAライブラリーを作製した。

20

【0152】

ベクターに複数のインサートが挿入されることを防止するために、低いモル比のEagI消化cDNA断片インサートを使ってpBluescript SK+のNotI部位へのライゲーションを行なった。形質転換を行ない、1000個を超える独立した細菌クローンを拾い、グリセロール中-80で保存した。ライゲーション混合物の残りは、将来行われる形質転換に備えて-80で保存した。

30

【実施例2】

【0153】

p0vary1(p01)ライブラリーインサートの初回配列解析

本発明者らは、cDNAライブラリーのp01サブトラクティブハイブリダイゼーションによって得た331個のインサートの配列解析を行った。Applied Biosystems 373 DNAシーケンサーを使ってこれらのクローンを配列決定した。米国国立バイオテクノロジー情報センターのデータベースを使ってBLAST検索を行なった。DNASTAR解析プログラムを使って新規配列をオープンリーディングフレームに関して解析し、以前に同定された新規配列と比較した。そのデータを表1に要約する。表に示すように、クローンの大半は既知遺伝子であるか、マウスまたはヒトESTに一致した。9.4%のクローンがデータベース中のどの既知配列とも一致しなかった。

40

【0154】

【表1】

## p01 cDNAクローンのデータベース検索の要約

p01 cDNAマッチ	同定された数	百分率
既知遺伝子	180	54.4%
マウス/ヒトEST	120	36.2%
まれなEST (1ESTマッチ)	(8)	(2.4%)
2細胞ライブラリー由来のEST	(3)	(0.9%)
マッチなし	31	9.4%
合計	331	100%

10

## 【実施例3】

## 【0155】

## 卵巣発現遺伝子の発現解析とcDNAスクリーニング

どのデータベースの配列とも一致しなかったすべてのcDNAに対してノーザンブロット解析を行なった。また、主としてマウス2細胞胚cDNAライブラリーに由来するESTと一致する配列（例えば01-184および01-236）も解析した。後者のEST群を解析した理論的根拠は、卵母細胞で高レベルに発現されるmRNAは2細胞期まで持続する可能性があり、卵子の受精または雄性および雌性前核の融合を含む初期胚発生に関与する可能性があるということである。

## 【0156】

20

新規卵巣遺伝子の初期スクリーニングの結果を表2に記載する。23個のクローンをノーザンブロット解析したところ、これらのクローンのうち8個がGdf9ノックアウト卵巣中でアップレギュレートされることが明らかになり、このことから、使用したサブトラクティブハイブリダイゼーションプロトコルは妥当であったことが示された。また、成体C57BL/6/129SvEv雑種マウス（卵巣RNA）またはSwiss WEBSTERマウス（他の全組織）から単離した全RNAを使ってノーザンブロット解析を行なったところ、これらのクローンのうち、2細胞ライブラリーから配列決定されたESTと一致する2つのクローンを含む4つのクローンが、卵巣だけに発現することが明らかになった（図1）。01-236断片プローブ（749bp）によって、約1.0kbの転写物が検出された（図1）。現在までに数個のクローンをその卵巣局在についてインサイチュハイブリダイゼーション解析によって解析した（図2）。クローン01-180、01-184および01-236は卵母細胞特異的であり、一次（単層）前胞状卵胞から排卵に至るまで卵母細胞中に発現していた（図2）。

30

## 【0157】

## 【表2】

## 機能がわかっていない卵巣cDNAの解析

PO1 cDNA	成体でのmRNA 発現	Gdf9ノックアウト 卵巣でのアップレ ギュレーション	データベース との一致	追加実験 (インサイチュールハイブリダイゼー ション; 染色体マッピング)
PO1 cDNA	成体でのmRNA 発現	Gdf9欠損卵巣での アップレギュレー ション	データベース との一致	追加実験 (インサイチュールハイブリ ダイゼーション; 染色体マッピング)
24	多数	なし	-	なし
27	多数	あり	-	インサイチュール実験で卵巣特異的
37	多数	あり	-	なし
70	多数	なし	-	なし
91			1 EST (2細胞)	
97	多数	なし	?	なし
101	多数	なし	-	なし
114	多数	なし	-	なし
110	多数	あり	-	なし
126	多数	あり	-	なし
180	卵巣特異的	あり	-	インサイチュール実験で卵巣特異的
184	卵巣特異的	あり	2以上のEST (すべて2細胞)	インサイチュール実験で卵巣特異的
186	卵巣特異的	あり	-	インサイチュール実験で顆粒層細胞特異 的
223	多数	なし	-	なし
224	多数	なし	-	なし
236	卵巣特異的	あり	6EST (2c細胞 および他の細 胞)	インサイチュール実験で卵巣特異的
255	多数	なし	「ジンクフィン ガー」ドメ イン	
279	多数	なし	-	なし
317	多数	なし	-	なし
330	多数	なし	-	なし
331	多数	なし	-	なし
332	多数	なし	-	なし
334	多数	なし	-	なし
371	多数	なし	-	なし

10

20

30

01-236遺伝子産物は卵母細胞特異的である(図3)。01-236は原始卵胞(2型)または小さい3a型卵胞の卵母細胞では発現されないが(Pedersenら、1968)、中サイズの3a型卵胞およびすべての3b型卵胞(すなわち最大横断面内で20個を越える顆粒膜細胞が卵母細胞を取り囲んでいる卵胞)の卵母細胞で初めて検出された。01-236 mRNAの発現は胞状卵胞段階まで持続した。興味深いことに、01-236遺伝子産物の卵母細胞特異的発現パターンは、Gdf9(McGrathら、1995)および骨形成タンパク質15(Dubeら、1998)を含む本研究者らが研究した他の卵母細胞特異的遺伝子の発現に似ている。

## 【実施例4】

## 【0158】

Npm2のクローニング

野生型卵巣およびGdf9ノックアウトZAP Express卵巣cDNAライブラリーを合成し、スクリーニングして、上述した3つのクローンの完全長cDNAを単離した。各完全長cDNAを再びデータベース検索にかけ、オープンリーディングフレーム、開始ATGおよびタンパク質ホモロジーについて解析した。完全長cDNAはノーザンブロット解析から決定されたmRNAサイズに近い。予想アミノ酸配列を使ったデータベース検索により、新規タンパク質の考えうる機能と細胞局在を明確にするのに役立つ重要なドメイン(例えばシグナルペプチド配列、膜貫通ドメイン、ジンクフィンガーなど)を同定することができた。

## 【0159】

製造者の説明書に従って、Dubeら(1998)に記載したように、野生型卵巣またはGDF-9欠損卵巣から作製したMatzukラボラトリーZAP Express(Stratagene)卵巣cDNAライブラリ

40

50

ーを、実施例1で同定された01-236部分cDNA断片を使ってスクリーニングした。簡単に述べると、野生型マウスまたはGDF-9ノックアウトマウス卵巣cDNAライブラリーの約300,000クローンを、チャーチ (Church) 溶液中、63 °C で、[ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTPランダムプライムドプローブにハイブリダイズさせた。フィルターを0.1×チャーチ溶液で洗浄し、-80 °C で終夜露出した。

#### 【0160】

マウス卵巣cDNAライブラリーの一次スクリーニングでは、01-236 cDNA断片により、スクリーニングした300,000個のうち22個の陽性ファージクローンが検出された。これらのクローンのうち、mRNAサイズに近く、2つの独立したライブラリーに由来する2つのクローン (236-1と236-3) を、制限エンドヌクレアーゼ消化およびDNA配列解析によってさらに解析した。これらの独立クローンは984bpのオーバーラップコンティグ (ポリA配列を除く) を形成し、207アミノ酸のオープンリーディングフレームをコードする (図4)。ポリAテールを含めると、この配列はノーザンブロット解析でみられた約1.0kb mRNAに近くなることから、5'UTR配列のほぼ全てが単離されたことが示唆される。ヌクレオチド配列を公開データベース検索にかけたが、有意な一致は得られなかった。しかし、207アミノ酸のオープンリーディングフレームを使ってデータベース検索を行なったところ、いくつかの種のいくつかのヌクレオプラスミンホモログとの高いホモロジーが明らかになった。興味深いことに、01-236はアフリカツメガエルヌクレオプラスミンと最も高いホモロジーを示す。01-236はアミノ酸レベルでアフリカツメガエルヌクレオプラスミンと48%一致した (図4)。このホモロジーおよび両遺伝子産物の卵母細胞における発現パターンから判断して、この遺伝子はアフリカツメガエルヌクレオプラスミン [Xnpm2と呼ばれる (MacArthurら、1997)] の哺乳類オルソログであるので、本発明者らはこの遺伝子をNpm2と命名した。

10

20

#### 【0161】

Npm2cDNA配列を使ってESTデータベースを検索することにより、マウスNpm2に相同な配列を含む2つのヒトcDNAクローンが見つかった。これらの2つのESTの配列解析を行った。これら2つの独立したクローンは923bpのオーバーラップコンティグを形成し、これは214アミノ酸のオープンリーディングフレームをコードしていた。アミノ酸レベルでは、ヒトNP M2はXnpm2およびマウスNpm2に対して、それぞれ48%および67%一致していた (図5)。

#### 【0162】

カエルと哺乳類のNPM2配列を比較したところ、いくつかの興味深い特徴が認められた。ヌクレオプラスミンはKR-(X)10-KKKKからなる二極性核移行シグナルを持つ (Dingwallら、1987)。ヌクレオプラスミン中のこれらの塩基性アミノ酸クラスターのどちらかを欠失させると、核への移行が妨げられた (Robbinsら、1991)。マウスとヒトのNPM2配列を解析したところ、この二極性配列は上記2つのタンパク質間で100%保存されていた (図5)。したがって、哺乳類NPM2は核に移行し、主にそこで機能すると予想された。

30

#### 【0163】

また、負荷電残基の長いストレッチも、NPM2とヌクレオプラスミンの間で保存されていた。NPM2のアミノ酸125~144と、ヌクレオプラスミンのアミノ酸128~146は、ほとんどがグルタミン酸残基とアスパラギン酸残基であり、NPM2では20残基のうちの19残基が、またヌクレオプラスミンでは19残基のうちの16残基がAspまたはGluである。アフリカツメガエルヌクレオプラスミンのこの領域は、正に荷電したプロタミンおよびヒストンへの結合と結びつけられている。したがって、NPM2のこの酸性領域にも同様の機能が予想された。

40

#### 【0164】

NPM2配列およびヌクレオプラスミン配列のもう一つの明白な特徴は、セリン残基およびスレオニン残基数の多さである。NPM2配列は19残基のセリンと17残基のスレオニン (すなわち全残基の17.2%) を含有し、ヌクレオプラスミンは12残基のセリンと11残基のスレオニン (すなわち全残基の11.5%) を持っていた。NPM2配列およびヌクレオプラスミン配列から、多数の推定リン酸化部位が予想された。これら2つのタンパク質の間で保存されていたいくつかの推定リン酸化配列を図5に示す。ヌクレオプラスミンのリン酸化はヌクレオプラスミンの核への移行と、その活性とを増加させると考えられた (Sealyら、1986; Cot

50

tenら、1986；Vancurovaら、1995；Lenoら、1996）。同様に、リン酸化はNPM2活性も変化させるだろう。このように、マウスおよびヒトNPM2とアフリカツメガエルヌクレオプラスミンはどちらもmRNAレベルで卵母細胞（および卵子）特異的であり、最も高い一致度を示すので、哺乳類NPM2とカエルヌクレオプラスミンとはオルソログであると結論した。

【0165】

【実施例5】

【0166】

Npm2遺伝子の構造

3つの新規卵母細胞特異的cDNAはすべてオープンリーディングフレームを持つことが、研究によってわかった。

10

【0167】

マウスNpm2遺伝子を同定するために、完全長Npm2cDNAの1つ（クローン236-1）を使って、マウス129/SvEvゲノムライブラリー（Stratagene）をスクリーニングした。500,000個のファージをスクリーニングして12個の陽性ファージを同定した。オーバーラップしたこれらのファージクローンのうちの2つ、すなわち236-13と236-14（約37kbの全ゲノム配列）を使って、マウスNpm2遺伝子の構造を決定した。マウスNpm2は9個のエクソンによってコードされ、約6.6kbにまたがっている（図6ならびに図7Aおよび7B（配列番号7A））。中サイズの2つのイントロン（イントロン4および5）が、この遺伝子サイズの大半を占めていた。開始ATGコдонはエクソン2に存在し、終止コдонはエクソン9に存在した。スプライス供与部位とスプライス受容部位（図7Aおよび7B（配列番号7））はげっ歯類動物に見いだされるコンセンサス配列とよく一致し、すべてのイントロン-エクソン境界が「GT-AG」則に従っていた（Senapathyら、1990）。コンセンサスポリアデニル化シグナル配列が、上記2つの単離cDNA中に存在するポリA領域の上流に見いだされた（図7Aおよび7B（配列番号7））。

20

【実施例6】

【0168】

マウスNpm2遺伝子の染色体マッピング

マウスで遺伝子の染色体マッピングを行うと、マウスの自然突然変異または誘発突然変異に関係する候補遺伝子が同定される。単離された新規卵母細胞特異的cDNAの機能解析をさらに助けるために、Research Geneticsの放射線ハイブリッドパネル（Radiation Hybrid Panel）を使って、これらのマウス遺伝子をマッピングした。この技術を使ってマッピングされた遺伝子を表3に示す。また、ヒト染色体上のシンテニー領域を同定することにより、これらの新規卵母細胞遺伝子の1つまたは複数が、これらの領域にマッピングされる既知のヒト疾患の候補遺伝子であると同定されうる。

30

【0169】

【表3】

部分cDNAまたは完全長cDNAの解析

pO1 cDNA	ORF	データベースホモログ
O1-180	361aa	なし
O1-184	426	なし
O1-236	207	あり：アフリカツメガエルヌクレオプラスミンホモログ（81%類似）

40

マウスNpm2遺伝子をマッピングするために、本研究者らは、Research Geneticsの放射線ハイブリッドパネル、ジャクソンラボラトリー戻し交雑DNAパネルマッピングリソース（Jackson Laboratory Backcross DNA Panel Mapping Resource）およびジャクソンラボラトリーマウス放射線ハイブリッドデータベース（Jackson Laboratory Mouse Radiation Hybrid Database）を利用した。最後のエクソン内にあるフォワードプライマー（配列番号17：GCAAAGAAGCCAGTGACCAAGAAATGA）およびリバースプライマー（配列番号18：CCTGATCATGC

50

AAATTTTATTGTGGCC) を使って、マウスには存在するがハムスターには存在しない229bpの断片をPCR増幅した。これらのプライマーを使うことによって、マウス *Npm2* 遺伝子は14番染色体の中央にマッピングされた(図8)。 *Npm2* はD14Mit32との連鎖(LODは11.2)を示し、またD14Mit203とも7.8のLODを持っていた。この領域はヒト染色体8p21とシンテニックである。

#### 【実施例7】

##### 【0170】

新規卵巢発現遺伝子を欠くノックアウトマウスの作出

上で得た遺伝子配列を使って、胚性幹(ES)細胞中の01-180、01-184および01-236遺伝子を突然変異させるためのターゲティングベクターを作製する。これらのターゲティングベクターを *hprt* 陰性AB2.1 ES細胞系にエレクトロポレートし、HATおよびFIAU中で選択する。クローンをサザンブロット解析のために処理し、5'および3'外部プロンプを使ってスクリーニングする。正しい突然変異を持つES細胞を胚盤胞に注入してキメラを作出し、最終的には突然変異型01-180、01-184および01-236遺伝子に関するヘテロ接合体およびホモ接合体を作出する。

10

##### 【0171】

01-180、01-184および01-236の発現は卵巢に限定されていたので、これらの01-180ノックアウト、01-184ノックアウトおよび01-236ノックアウトマウスは生存可能であるが、これらの遺伝子産物を欠く雌は妊性が変化している(すなわち不妊、低受胎性または超受胎性である)可能性がある、と本発明者らは予想する。通常の当業者の能力の範囲で十分に可能な技術を使って、卵胞形成、卵形成または受精に必要な卵巢内タンパク質に関する形態学的、組織学的および生化学的情報について、突然変異マウスを解析する。これらのタンパク質の不在は妊性が増加または低下した雌マウスをもたらさうと予想される。これらの研究は、同様の特発性表現型を持つヒト生殖状態の検索につながるだろう。

20

#### 【実施例8】

##### 【0172】

01-184トランスジェニック動物の作出

01-184遺伝子の両側にゲノム配列を配置し、マイクロインジェクションによって受精卵に導入する。マイクロインジェクションを行った卵子を雌宿主に着床させ、子孫を導入遺伝子の発現に関してスクリーニングする。トランスジェニック動物は、爬虫類、両生類、鳥類、哺乳類および魚類を含む(ただしこれらに限らない)多くの動物の受精卵から作出することができる。これらの動物は、01-184を過剰発現するように、または突然変異型の01-184を発現するように作出される。

30

#### 【実施例9】

##### 【0173】

マウス *Npm2* の卵巢特異的発現

*Npm2* 遺伝子産物の細胞特異的発現を明確にするために、野生型マウス卵巢を使ってインサイチューハイブリダイゼーション解析を行った。

##### 【0174】

インサイチューハイブリダイゼーションは既述のように行った(Albrechtら、1997; Elvinら、1999)。簡単に述べると、C57B16/129SvEvマウスの卵巢を解剖し、PBS中の4%パラホルムアルデヒドで一晩固定した後、処理し、パラフィンに包埋し、5mmに薄切した。断片01-236をテンプレートとして、 $[a^{32}P]$ -dUTPと共に使用し、Riboprobe T7/SP6コンビネーションシステム(Promega)を使って、センス鎖およびアンチセンス鎖を作製した。ハイブリダイゼーションは、1スライドあたり各リボプローブについて $5 \times 10^6$  cpmを使って、50%脱イオンホルムアミド/0.3M NaCl/20mM Tris-HCl(pH8.0)/5mM EDTA/10mM  $NaPO_4$  (pH8.0)/10%硫酸デキストラン/1xデンハート液/0.5mg/ml酵母RNA中、50~55℃で、16時間行った。高ストリンジェンシーの洗浄を、2xSSC/50%ホルムアミドおよび0.1xSSC中、65℃で行った。脱水した切片をNTB-2乳剤(Eastman Kodak、ニューヨーク州ロチェスター)に浸漬し、40℃で4~7日間露出した。スライドを現像し定着した後、ヘマトキシリンで染

40

50

色し、マウントして写真撮影を行った。

#### 【0175】

Npm2遺伝子産物は卵母細胞特異的だった(図9Aおよび9B)。プローブは成長するすべての卵母細胞での特異的発現を示す。卵母細胞特異的発現は初期単層一次卵胞(3a型)に初めて認められ、単層3b型卵胞と、胞状(an)卵胞を含むその後のすべての段階では、発現量が多くなった。「センス」プローブは、この卵母細胞特異的遺伝子のシグナルを検出しない。

#### 【実施例10】

#### 【0176】

NPM2の細胞内局在

抗NPM2抗体を使ったマウス卵巢の免疫組織染色によって、NPM2タンパク質の細胞内局在を決定した。

#### 【0177】

完全長マウスNPM2タンパク質をコードするcDNAを、PCRで増幅することにより、開始コドンの前にBamH1部位を導入し、停止コドンの前にXhoI部位を導入した。Hisタグ付きNPM2タンパク質を作製するために、このPCR断片をpET-23b(+)(Novagen)にクローニングし、配列決定を行って突然変異がないことを確認した。組換えNPM2タンパク質はpETシステムマニユアル(Novagen)に記載されているように精製した。2頭のヤギを精製Hisタグ付きNPM2で免疫処置して、特異的かつ高親和性の抗体を産生させた。

#### 【0178】

卵巢をPBS中の4%パラホルムアルデヒドで2時間固定し、処理し、パラフィンに包埋し、5mmの厚さに薄切した。ヤギ抗NPM2ポリクローナル抗血清を、Common Antibody Dilute(BioGenex)で1:2000に希釈した。同じヤギから得た免疫前ヤギ血清を対照として使用した。すべての切片をUniversal Blocking Reagent(BioGenex)中で10分間ブロックし、一次抗体と共に室温で1時間インキュベートした。NPM2検出は、抗ヤギビオチン化二次抗体、ストレプトアビジン結合アルカリホスファターゼ標識、およびNew Fuschin基質(BioGenex Laboratories, Inc.、カリフォルニア州サンラモン)を使って行った。

#### 【0179】

1~8細胞胚および胚盤胞を、96ウェル丸底プレートにて、PBS中の4%パラホルムアルデヒドで、2時間固定し、0.85%食塩水で洗浄し、数滴の1.5%アガロースに包埋した。そのアガロース含有胚を脱水し、パラフィンに包埋し、上述のように解析した。

#### 【0180】

Npm2mRNAの発現パターンと一致して、NPM2タンパク質は3型段階から胞状濾胞段階まで卵母細胞中で発現していた。ランダム周期マウスでは、抗NPM2抗体が核を強く特異的に染色した(図9C)。卵母細胞核は卵核胞(GV)とも呼ばれる。黄体形成ホルモン(LH)の排卵前サージはGV卵母細胞の成熟を加速し、GV崩壊(GVB)を促進する。マウスにPMSCとhCGを注射して過剰排卵を誘発すると、NPM2タンパク質は卵核胞崩壊後に胞状卵胞の卵母細胞に再分布する。排卵前GVB卵母細胞では、NPM2は卵母細胞の細胞質に均等に分布していた(図9D)。xNPM2は受精後の精子DNA脱凝縮および前核形成に関与することが示唆されているので、この再分布により、細胞質NPM2が受精時に精子核と相互作用するために適正な位置についたことが示唆された。受精後のNPM2発現を調べるために、初期胚を固定し、薄切し、抗NPM2抗体で染色した。接合子では、NPM2は再び核に移行し始めた。図9Eは、一方の前核は形成されたが他方はまだ完成しておらず、多少のNPM2がまだ細胞質に存在するという中間段階を示している。その後のある時点では(図9F)、NPM2のすべてが前核内に存在した。2細胞胚(図9G)および8細胞胚(図9H)では、抗体は依然としてもっぱら核内にNPM2タンパク質を検出した。胚盤胞(胎生3.5日)では、NPM2がかなり低下したレベルで依然として検出されたが、胎生6.5日の胚では、NPM2発現は検出できなかった。

#### 【実施例11】

#### 【0181】

マウスNpm2遺伝子の標的破壊およびNpm2ノックアウトマウスの作出

10

20

30

40

50



哺乳類卵母細胞発生および初期胚発生におけるNPM2の役割を調べるために、本発明者らはマウスNpm2遺伝子座をES細胞技術を使って破壊した。

#### 【0182】

エクソン2および3ならびにエクソン4のスプライス接合部を欠失させるために、Npm2用のターゲティングベクターを構築した。この欠失ターゲティングベクターは、左から右に、2.2kbの5'Npm2ホモロジー、PGK-hprt発現カセット、4.6kbの3'Npm2ホモロジーおよびMC1-tk(チミジンキナーゼ)発現カセットを含む。線状化したNpm2ターゲティングベクターをAB2.1 ES細胞にエレクトロポレートした。HAT(ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジン)ならびにFIAU[1-(2'-デオキシ-2'-フルオロ-b-D-アラビノフラノシル)-5'-ヨードウラシル]を含むM15培地で、ES細胞クローンを選択した。ES細胞の培養および胚盤胞の収集と注入は、以前に、Matzukら(1992)に記述されている。ゲノムサザンプロット解析のために、BglII消化DNAをGeneScreen Plusナイロン膜に移し、エクソン9配列に相当する外部190bp PCR合成断片(3'プローブ)でプローブした。DNAをBamH1で消化した場合は、野生型対立遺伝子とNpm2ヌル(Npm2tm1Zuk)対立遺伝子とを識別するために、内部200bp PCR合成断片(49bpエクソン1+150bp 5'上流配列)も使用した。DNAをPst1で消化した場合は、137bpのエクソン2配列を含むPCR合成プローブを使って、Npm2tm1Zuk対立遺伝子に関してホモ接合性のマウスにエクソン2が存在しないことを検証した。正しくターゲティングされた1つのES細胞クローン(Npm2-118-B11と呼ぶ)を増殖させ、ES細胞をC57B1/6胚盤胞に注入して、キメラマウスを取得し、最終的にはそこからC57B16/129/SvEv雑種および129/SvEv同系交配F1子孫を取得した。

10

20

#### 【0183】

翻訳開始コドンを含むエクソン2ならびにエクソン3およびエクソン4スプライス接合部を欠失させるためにターゲティングベクターを構築した(図10A)。エクソン2以外の部分では、残りの配列には他にATGは1個しか存在せず(エクソン6)、このATGは酸性ドメインの下流にあって、二極性核局在化コンセンサス配列の間に位置した。したがってこのベクターは、Npm2ヌル対立遺伝子をもたらした。F1ヘテロ接合性(Npm2tm1Zuk/+;ここではNpm2<sup>+/-</sup>と呼ぶ)マウスは生存可能で妊性であり、NPM2不在の発生面での帰結を調べるためにこれを交雑した。これらの交雑によって得られたF2子孫230匹の遺伝子型解析(図10B;表4)は、1:2:1という通常のメンデル比に従い、同じような数の雄および雌ホモ接合体(Npm2<sup>-/-</sup>)が生成した。したがって、Npm2ホモ接合性突然変異雄および雌マウスは生存可能であり、正常な性分化を持つように見えることから、Npm2は誕生前には必要ないことが証明された。

30

#### 【0184】

#### 【表4】

ヘテロ接合体交配

	-/-	+/-	野生型	合計
雄	27	71	19	117
雌	27	53	33	113
合計	54	124	52	230
%	23	54	23	100

40

Npm2ホモ接合体として遺伝子型別されたマウスがNpm2を欠いていることを確認するために、野生型Npm2遺伝子のエクソン2にハイブリダイズするcDNAプローブを使って、サザンプロット解析を行った。図に示すように(図10C)、このプローブは、エクソン2を欠失させたホモ接合性(Npm2<sup>-/-</sup>)マウスから得たDNAには、なんのシグナルも検出することができなかった。さらに、Npm2ホモ接合体および対照に対して、Npm2免疫組織化学的解析を行った。ヘテロ接合型対照から得た卵巣にはNPM2タンパク質の発現が認められるが(図11Aおよび11C)、ホモ接合体卵巣中の卵母細胞にはタンパク質は検出されなかった(図11Bおよび11D)。これにより、Npm2tm1Zuk突然変異はヌル対立遺伝子であり、Npm2ホモ接合体はN

50

PM2タンパク質を完全に欠いていることが確認された。

# 【実施例 1 2】

## 【0 1 8 5】

Npm2の喪失は雌の不妊および低受胎をもたらす

生殖機能におけるNPM2の機能を調べるために、成体ホモ接合性雑種 (C57B1/6/129SvEv) 雄または雌マウスを対照ハイブリッドマウス (C57B1/6/129SvEv) と交雑した。Npm2mRNA およびタンパク質の雌特異的発現と合致して、Npm2<sup>-/-</sup>雄マウスは妊性があり、精巢に肉眼的または組織学的欠損はなかった (非掲載のデータ)。同様に、10匹の雌Npm2ヘテロ接合体をヘテロ接合性雄と5~8ヶ月の間の交雑したところ、8.55匹/リターで53リターの子孫が得られた (0.97リター/月) (表5)。対照的に、12匹のNpm2<sup>-/-</sup>雌マウスのうち9匹だけが5~8ヶ月の間に妊娠し、平均で2.75匹/リターの32リターをもたらした (0.43リター/月) (表5)。このように、Npm2の不足は、雌では低受胎および不妊につながるが、雄ではそのような影響はない。

## 【0 1 8 6】

### 【表 5】

Npm2ノックアウトマウスの交配

親の遺伝子型			母親	リター数	平均リターサイズ	リター/月
雄		雌			(平均±SEM)	(平均±SEM)
+/-	X	+/-	8	51	8.55±0.34*	0.97±0.03**
WT	X	-/-	12***	32	2.75±0.25*	0.43±0.10**

\* P<0.001

\*\* P<0.005

\*\*\* 3匹のマウスが不妊である

# 【実施例 1 3】

## 【0 1 8 7】

Npm2ヌル受精卵中の初期分割欠損

Npm2<sup>-/-</sup>雌マウスにおける妊性欠損の原因を決定するために、卵巣をまず形態学的および組織学的に調べた。Npm2<sup>-/-</sup>卵巣と対照卵巣の間に肉眼レベルまたは組織学的レベルで相違はない (図11Eおよび11F)。Npm2<sup>-/-</sup>卵巣には黄体の形成を含む正常な卵胞形成が観察されたことから、これらのマウスでは排卵が起こることが示唆された。

## 【0 1 8 8】

排卵が起こることを確認するために、またNpm2<sup>-/-</sup>マウスの不妊および低受胎の原因をさらに調べるために、野生型、ヘテロ接合性およびホモ接合性マウスの薬理的過剰排卵を行い、卵子を卵管から収集し、インピトロ培養した。

## 【0 1 8 9】

既述のように (Hoganら、1994; Matzukら、1996)、未成熟 (21~24日齢) 雌に5IUのPMSG (妊馬血清ゴナドトロピン) を腹腔内注射し、次に5IUのhCG (ヒト絨毛性ゴナドトロピン) を注射して、過剰排卵を誘発した。注射したマウスを野生型雄マウスと交尾させた。翌朝、これらのマウスの卵管から卵子を収集した。M2培地 (Sigma) 中の0.3mg/mlヒアルロニダーゼを使って卵丘細胞を卵子から取り出した。卵子は、5% CO<sub>2</sub> および95% 空気の雰囲気を持つ37℃の湿潤培養器中、軽質パラフィン油で覆ったM16培地 (Sigma) で培養した (Hoganら、1994)。

## 【0 1 9 0】

DNAを染色するために、卵子をPBS中で1回洗浄し、10mg/mlビスベンズイミド (Hoechst 33258) を含む4% パラホルムアルデヒド/PBS中、室温で20分間インキュベートし、PBSで2回洗浄し、Fluoromount-Gでマウントし、蛍光顕微鏡 (Axioplan2イメージング、Carl Zeiss) で写真撮影した。

## 【0 1 9 1】

21~24日齢マウスの妊馬血清ゴナドトロピン/ヒト絨毛性ゴナドトロピン過剰排卵処置は

、 $Npm2^{-/-}$  雌に、野生型またはヘテロ接合性対照と同じような数の排卵数をもたらした（表6）。 $Npm2^{-/-}$  と対照との間で、受精の証拠である第二極体の生成に有意な相違はないので、 $Npm2^{-/-}$  マウスの卵子は精子によって正常に受精されるように見える。しかし、 $Npm2^{-/-}$  マウスでは、1細胞胚から2細胞胚への分割に、大きな欠損があった。（表6、図12A～12D）。2細胞胚の数がかかなり減少したことの他に、奇異で発生的に異常な胚が24時間のインビトロ培養中に現れた（図12B）。対照卵子（図12C）とは異なり、 $Npm2^{-/-}$  卵子は、現在のインビトロ培養アッセイでは、4細胞胚段階まで進むことができなかった（図12D）。したがって、 $Npm2^{-/-}$  マウスにおける欠損は、胚の生存力の低下を招くようである。

【0192】

【表6】

10

過剰排卵によって放出された卵子のインビトロ培養

遺伝子型	雌の数	卵子 (平均±SEM)	極体の存在 (平均±SEM)	2細胞胚 (平均±SEM；%)
野生型	7	14.4±3.8	8.6±1.4	7.3±2.1** (50.5%)
$Npm2^{+/-}$	21	12.6±2.1	6.9±0.9	7.1±1.3** (56.3%)
$Npm2^{-/-}$	15	15.7±3.9	7.2±1.7	1.3±0.4** (8.3%)

\*卵子全体から発生した2細胞胚の百分率

\*\* $P < 0.001$

【実施例14】

20

【0193】

01-180遺伝子および01-180偽遺伝子の構造

ZAP-expressマウス卵巣cDNAライブラリーをスクリーニングして、完全長01-180 cDNAを単離した。ポリAテールを除くと、完全長01-180 cDNAは約1.3kbで、ヌクレオチド26からヌクレオチド1108までのオープンリーディングフレームをコードしている。01-180 cDNAは、例えばマウス16細胞胚cDNAライブラリーのEST (AU044294) およびマウス未受精卵cDNAライブラリーのEST (AU023153) など、データベース中のいくつかのESTと相同である。01-180 cDNA ORFから予想されるポリペプチドは361アミノ酸からなり、40kDaの分子量を持つ。公開タンパク質データベースを検索したが、既知のタンパク質ホモログは見つからなかった。二極性核局在化シグナルが333～350位に見いだされる（配列番号19：Lys-Arg-Pro-His-Arg-Gln-Asp-Leu-Cys-Gly-Arg-Cys-Lys-Asp-Lys-Arg-Leu-Ser）ことから、01-180は卵母細胞核または胚核に移行しうることが強く示唆される。

30

【0194】

マウス01-180遺伝子をクローニングするために、マウス129SvEv株から作製したマウスゲノムIFix IIファージライブラリーを、完全長01-180 cDNAを使ってスクリーニングした。12個の独立した組換えクローンが単離された。そのうちの8つはユニークなクローンと同定されたので、サブクローニング、サザンブロット解析および配列決定によってさらに特徴づけた。驚いたことに、この遺伝子のエクソン2の650ヌクレオチド上流から始まる1つのゲノムインサートDNAだけが、01-180遺伝子の3'部分と一致した。残りのクローンは、01-180 cDNAと98%一致するエクソンを持つ近縁の遺伝子に対応していた。エクソンの相違に基づいて、01-180遺伝子特異的プライマーおよび類縁遺伝子特異的プライマーを設計し、逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）を行った。脳、心臓、肺、脾臓、肝臓、小腸、胃、腎臓、子宮、精巣および卵巣を含む8週齢C57マウス組織由来のcDNAをテンプレートとして使用した。ノーザンブロット解析と一致して、01-180 cDNAはもっぱら卵巣だけで増幅された。一方、類縁遺伝子cDNAはどの組織にも検出できなかった。これにより、マウスゲノムIFix IIファージライブラリーから単離された類縁遺伝子は偽遺伝子であることが示された。BAC129SvJマウスゲノムライブラリーを、2組の01-180遺伝子特異的プライマーによるPCRでスクリーニングしたところ、BACクローンが1つだけ単離された。そのBACおよびIFix IIファージクローンのコード領域全体およびエクソン-イントロン境界の配列決定により、01-180と01-180偽遺伝子はどちらも4つのエクソンと3つのイントロンとを含むこ

40

50

とが明らかになった（図14）。図15に示すように、エクソン-イントロン境界はすべてGT-AGイントロンドナー-アクセプタープライス則に合致していた。01-180遺伝子と偽遺伝子との主な相違は、偽遺伝子のエクソン1に13ntのギャップが存在することであり、本発明者らは、これがフレームシフトをもたらし、偽遺伝子ではエクソン2で早くも停止が起きると考えている。エクソン2の配列は01-180遺伝子でも偽遺伝子でも同一であり、エクソン3および4には一塩基対突然変異がある（図15）（配列番号11および配列番号12）。

#### 【実施例15】

##### 【0195】

#### マウス5番染色体

全ゲノム放射線ハイブリッドパネルT31（McCarthyら、1997）をResearch Genetics（アラバマ州ハンツビル）から購入し、製造者の説明書に従って使用した。パネルは照射マウス胚初代細胞（129aa）をハムスター細胞と融合させることによって構築された。01-180のハムスターホモログの配列はわかっていないので、ハムスターホモログが同時増幅される危険を最小限に抑えるために、本発明者らは、マウス配列の3'非翻訳領域からリバープライマーを設計した（MakalowskiおよびBoguski、1998）。01-180遺伝子特異的プライマーは（配列番号20）5'-CTAGAAAAGGGGACTGTAGTCACT-3'フォワードおよび（配列番号21）5'-TGCATCTCCACACAAGTCTTGCC-3'リバープライマーとした。偽01-180遺伝子特異的プライマーは（配列番号22）5'-CTAGAAAAGGGGACTATAGGCACC-3'フォワードおよび（配列番号23）5'-TGCATCTCTCACACAAGTGTGCT-3'リバープライマーとした。これら2組のプライマーの特異性を、A23ハムスターDNAおよび129マウスDNAで検証した。PCR反応は、1mlの各パネルDNA、1.25UのTaq platinum DNAポリメラーゼ（Gibco、メリーランド州ロックビル）、付随試薬類（0.25mM dNTP類、1.5mM MgCl<sub>2</sub>、1×PCR緩衝液）および0.4mMの各プライマーを含む最終液量15mlで行った。94℃で4分間の初期変性ステップの後、30サイクルの増幅（94℃で40秒、60℃で30秒、72℃で30秒）を行い、最後に72℃で7分間の伸張を行った。

##### 【0196】

01-180遺伝子特異的プライマーと01-180偽遺伝子特異的プライマーをそれぞれ設計し、T31マウス放射線ハイブリッドパネルの細胞系DNA 100個すべてを、PCRにより、二連のアッセイでスクリーニングした。各遺伝子に関するデータをJackson Laboratory Mouse Radiation Hybrid Mapper Serverでの解析に供した。どちらの遺伝子もマウス5番染色体の同じ領域に位置していた。01-180遺伝子座は、2つのマーカーD5Buc48およびTxkの間、40cMにあり、一方、01-180偽遺伝子はコード遺伝子座のすぐ遠位側、TecとD5Mit356の間、41cMにある（図16）。これはヒト染色体4p12の領域とシンテニックである。

#### 【実施例16】

##### 【0197】

#### マウス卵巣における01-180の局在

01-180特異的プローブを使ってインサイチュハイブリダイゼーションを行った。[<sup>35</sup>S]UTP標識アンチセンスおよびセンスプローブを、Riboprobe T7/T3コンビネーションシステム（Promega、ウィスコンシン州マディソン）によって作製した。ハイブリダイゼーションはAlbrechtら（1997）およびElvinら（1999A）に記載されている方法に従って行った。

##### 【0198】

インサイチュハイブリダイゼーションにより、これらの卵巣内で卵母細胞に局在した01-180の高レベルな発現が明らかになった。卵母細胞内での01-180の発現は、単層（一次）卵胞段階から胞状卵胞段階まで顕著であったが、原始卵胞段階では発現は認められなかった。Gdf9ノックアウト卵巣では卵胞の発育が一次卵胞段階で停止するために卵胞数が増えるので、より多くの01-180陽性卵母細胞が各切片に検出された（図13）。

#### 【実施例17】

##### 【0199】

#### 01-180の解析

当技術分野でよく知られておりよく使用されている標準的な技術を使ってノーザンブロッ

10

20

30

40

50

ト解析を行った。簡単に述べると、卵巣mRNAを野生型およびGDF-9(-/-)マウスから単離した。図18は01-180が卵巣組織に特異的であることを示している。

#### 【0200】

当技術分野でよく知られておりよく使用されている標準的な技術を使ってウェスタンブロット解析を行った。簡単に述べると、卵巣タンパク質を野生型およびGDF-9(-/-)マウスから単離した。01-180に対する抗体を使って、組換え01-180タンパク質のサイズを天然01-180タンパク質のサイズと比較した。図19により、組換え01-180タンパク質は、GDF-9(-/-)マウスから単離された卵巣に由来する天然01-180と、同じようなサイズを持つことが明らかになった。

#### 【実施例18】

##### 【0201】

01-180の細胞内局在

01-180タンパク質の細胞内局在を、マウス卵巣を抗01-180抗体で免疫組織染色することによって決定した。

##### 【0202】

完全長マウス01-180タンパク質をコードするcDNAをPCRで増幅することにより、開始コドンの前にBamH1部位を、そして停止コドンの前にXhoI部位を導入した。このPCR断片をpET-23b(+)(Novagen)にクローニングして、Hisタグ付き01-180タンパク質を製造し、配列決定して、突然変異が存在しないことを確認した。組換え01-180タンパク質はpET System Manual(Novagen)に記載されているように精製した。2匹のヤギを精製したHisタグ付き01-180で免疫処置して、特異的かつ高親和性の抗体を産生させた。

##### 【0203】

卵巣をPBS中の4%パラホルムアルデヒドで2時間固定し、処理し、パラフィンに包埋し、5mmの厚さに薄切した。ヤギ抗01-180ポリクローナル抗血清をCommon Antibody Dilute(BioGenex)で1:2000に希釈した。同じヤギから採取した免疫前ヤギ血清を対照として使用した。すべての切片をUniversal Blocking Reagent(BioGenex)中で10分間ブロックし、一次抗体と共に室温で1時間インキュベートした。Npm2検出は、抗ヤギビオチン化二次抗体、ストレプトアビジン結合アルカリホスファターゼ標識、およびNew Fuschin基質(BioGenex Laboratories, Inc.、カリフォルニア州サンラモン)を使って行った。

##### 【0204】

図20に、マウス卵巣における01-180の免疫染色を示す。図20に示すように、01-180タンパク質は、マウス卵母細胞および接合子の細胞質に特異的に局在するが、この時点より後では消失した。

#### 【実施例19】

##### 【0205】

01-180ノックアウトマウスの作出

01-180遺伝子を突然変異させるためのターゲティングベクターを、単離された配列から構築した(図17)。哺乳類卵母細胞の発生および初期胚発生における01-180の役割を調べるために、本発明者らはES細胞技術を使ってマウス01-180遺伝子座を破壊した。翻訳開始コドンを含むエクソン1を欠失させるためにターゲティングベクターを構築した。したがって、このベクターは01-180ヌル対立遺伝子をもたらした。

#### 【実施例20】

##### 【0206】

01-180の喪失は雌の不妊および低受胎をもたらす

生殖機能における01-180の機能を調べるために、成体ホモ接合性雑種(C57B1/6/129/vEv)雄または雌マウスを対照ハイブリッドマウス(C57B1/6/129/SvEv)と交雑した。01-180 mRNAおよびタンパク質の雌特異的発現と合致して、01-180<sup>-/-</sup>雄マウスは妊性があり、精巣に肉眼的または組織学的欠損はなかった。同様に、雌01-180ヘテロ接合体をヘテロ接合性雄と5~8ヶ月の間の交雑したところ、7.1匹/リターの子孫が得られた(表7)。これに対し、5~8ヶ月の間に妊娠した01-180<sup>-/-</sup>雌マウスはいなかった(表7)。このように、01

10

20

30

40

50

-180の欠損は、雌では低受胎および不妊につながるが、雄ではそのような影響はない。

【0207】

【表7】

01-180マウスの妊性

種畜		平均リター サイズ (子/リター)	性比 (雌/雄)	子の遺伝子型		
F	M			野生型	+/-	-/-
+/-	+/-	7.1	1 (119/114)	53 (23%)	121 (52%)	59 (25%)
+/-	-/-	8.8	0.94 (103/109)	0	111 (52%)	101 (48%)
-/-	+/-もしくは 野生型	0				

10

【実施例21】

【0208】

01-180ヌル受精卵中の欠損

01-180<sup>-/-</sup>、01-180<sup>+/-</sup>雌マウスにおける妊性欠損の原因を決定するために、卵巣をまず形態学的および組織学的に調べた。

20

【0209】

排卵が起こっていることを確認するために、また01-180<sup>-/-</sup>、01-180<sup>+/-</sup>マウスの妊性および低受胎の原因をさらに調べるために、野生型、ヘテロ接合性およびホモ接合性マウスの薬理的過剰排卵を行い、卵子を卵管から収集し、インビトロ培養した。図21および表8に示すように、2日目までに、わずかな01-180<sup>-/-</sup>接合子だけが2細胞段階に発育し、それらはいずれも、3日目までに4細胞段階に発育しなかった。これは大半が2日目までに2細胞胚に発育し、それらのうち大半が3日目および4日目までに胚盤胞に発育した01-180<sup>+/-</sup>接合子とは対照的だった。したがって、01-180<sup>-/-</sup>マウスにおける欠損は、受精後から胚盤胞の発生までに開始するようである。

30

【0210】

【表8】

01-180突然変異体マウスのインビボでの胚発生

01-180+/- (n=8)				01-180-/- (n=13)		
	総接合子 (D1)	2~4細胞 (D2)	>4細胞 (D3)	総接合子 (D1)	2~4細胞 (D2)	>4細胞 (D3)
平均	31.63	28.25	23.63	34.31	7.15	0.00
SD%	13.51	11.70	13.60	14.84	5.44	0.00
SEM		83.30	74.70		20.83	0.00
	4.78	4.14	4.81	4.12	1.51	0

40

【実施例22】

【0211】

ツーハイブリッド解析

ツーハイブリッドスクリーニングは、あるタンパク質の機能を、それが相互作用する他のタンパク質を同定することによって解明または特徴づけるために用いられる。

【0212】

タンパク質01-180または01-236または01-184を、興味あるタンパク質のDNAと共にGAL4のDNA結合ドメインを含むキメラタンパク質として製造する。このキメラタンパク質を発現させるヌクレオチド配列を含むプラスミドで、さまざまな標的タンパク質候補をコードする

50

さまざまなヌクレオチド配列に融合されたGAL4活性化ドメインを含むライブラリーに由来する代表プラスミドをも含む真核細胞を形質転換する。もし興味あるタンパク質（01-180、01-184または01-236）が標的タンパク質と物理的に相互作用するのであれば、GAL4活性化ドメインとGAL4 DNA結合ドメインとがつながれ、その結果、共同的に作用してレポーター遺伝子の転写を促進することができるようになる。01-180、01-236または01-184タンパク質と標的タンパク質候補との間に相互作用が起こらない場合は、GAL4成分は離れたままであり、レポーター遺伝子の転写を単独では促進することができない。

#### 【0213】

本発明およびその利点を詳細に説明したが、本願特許請求の範囲に規定する本発明の精神および範囲から逸脱することなく、さまざまな変更、置換、改変を施すことができると解釈すべきである。さらにまた、本願の範囲は、本明細書に記載した態様のプロセス、装置、製造、組成物、手段およびステップに限定されないものとする。本明細書に記載した対応する態様と実質的に同じ機能を果たすか、または実質的に同じ結果をもたらす、既存のまたは将来開発されるプロセス、装置、製造、組成物、手段、方法またはステップを、本発明に従って利用してもよいことは、本発明の開示から、当業者にはすぐに理解されるだろう。したがって、本願特許請求の範囲は、そのようなプロセス、装置、製造、組成物、手段、方法またはステップも、その範囲に包含するものとする。

#### 【0214】

##### [参考文献]

以下の参考文献には、本明細書の説明に関して、典型的な操作上の詳細または他の詳細を補足する記載があるので、これらは特に、参照により本明細書に組み込まれるものとする。

Albrecht, U.ら、(1997)「Molecular and Cellular Methods in Developmental Toxicology」(G.P. Daston編、フロリダ州ボカトン、CRC Press)の23～48頁。

Burglin, T.ら、(1987) Genes Dev 1, 97-107.

Carabatsos M.ら、(1998) Dev. Biol. 203, 373-384.

Chan, W.Y.ら、(1989) Biochemistry 28, 1033-9.

Channing, C.P.、(1970) Recent Prog. Horm. Res. 26, 589-622.

Cotten, M.ら、(1986) Biochemistry 25, 5063-5069.

Crevel, G.ら、(1997) J Struct Biol 118, 9-22.

Dilworth, S.ら、(1987) Cell 51, 1009-1018.

Dimitrov, S.およびWolffe, A. (1996) EMBO Journal 15, 5897-5906.

Dingwall, C.ら、EMBO J 6, 69-74.

Dong, J.ら、(1996) Nature 383, 531-535.

Dube, J.L.ら、(1998) Molecular Endocrinology 12, 1809-1817.

Earnshaw, W.ら、(1980) Cell 21, 373-383.

El-Fouly, M.A.ら、1970. Endocrinology 87, 288-293.

Elvin, J.A.およびMatzuk, M. M. (1998) Reviews of Reproduction 3, 183-195.

Elvin, J.A.ら、(1999) Mol Endocrinol 13, 1018-34.

Elvin, J.A.ら、(2000) Mol Cell Endocrinol 159, 1-5.

Elvin, J.A.ら、1999B. Mol. Endocrinol. 13, 1035-1048.

Elvin, J.A.ら、2000. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:10288-10293.

Hogan, B.ら、(1994)「Manipulating the mouse embryo-a laboratory manual」.

Howell CYら、Cell 104:829-38.

Ito, T., Tylerら、(1996) J Biol Chem 271, 25041-8.

Iwata, K.ら、(1999) Int J Biol Macromol 26, 95-101.

Krohne, G.およびFranke, W. (1980a) Proc Natl Acad Sci 77, 1034-1038.

Kumar, T. (1994) Human Rep 9, 578-585.

Kumar, T.R.ら、(1997) Nature Genetics 15, 201-204.

Laskey, R.ら、(1993) Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 339, 263-269.

10

20

30

40

50

- Leno, G.ら、(1996) J Biol Chem 271, 7253-7256.
- MacArthur, C.A.およびShackleford, G. (1997a) Genomics 42, 137-40.
- Maeda Yら、Zygote 6:39-45
- Maeda, Y.ら、(1998) Zygote 6, 39-45.
- Mahmoudi, M.およびLin, V.K. (1989) Biotechniques 7, 331-332.
- Matzukら、(1992) Nature 360, 313-319.
- Matzuk, M.M.ら、(1995) Nature 374, 356-360.
- Matzuk, M.M.ら、(1996) Recent Prog Horm Res 51, 123-54.
- McGrath, S.A.ら、(1995) Molecular Endocrinology 9, 131-136.
- McLay, D.およびClarke, H. (1997) Dev Biol 186, 73-84. 10
- Meric, F., Matsumotoら、(1997) J Biol Chem 272, 12840-12846.
- Mills, A.ら、(1980) J Mol Biol 139, 561-568.
- Nishimori, K.およびMatzuk, M.M. (1996) Reviews of Reproduction 1, 203-212.
- Ohsumi, K.およびKatagiri, C. (1991) Dev Biol 148, 295-305.
- Pedersen, T.およびPeters, H. (1968) Journal of Reproduction and Fertility 17, 55 5-557.
- Perreault, S. (1992) Mutat Res 296, 43-55.
- Philpott, A.およびLeno, G. (1992) Cell 69, 759-767.
- Philpott, A.ら、(1991) Cell 65, 569-578.
- Robbins, J.ら、(1991) Cell 64, 615-623. 20
- Schmidt-Zachmann, M.S.およびFranke, W.W. (1988) Chromosoma 96, 417-26.
- Sealy, L.ら、Biochemistry 25, 3064-3072.
- Senapathy, P.ら、Methods Enzymol 183, 252-278.
- Service, R. (1996) Science 272, 1258.
- Tong ZBら、Nat Genet 26:267-8.
- Vancurova, I.ら、(1995) J Cell Sci 108, 779-787.
- Vanderhyden, B.C.ら、(1993) Endocrinology 133, 423-426.
- Zuccotti Mら、J Endocrinol Invest 23:623-9.

# 【図面の簡単な説明】

## 【 0 2 1 5 】

30

【図1】 卵巣特異的遺伝子の多組織ノーザンブロット解析。01-180、01-184および01-236プローブを使って、全RNAに対してノーザンブロット解析を行なった。図に示すように、これらの遺伝子産物は卵巣特異的パターンを示す（OV, 卵巣；WT, 野生型；-/-, Gdf9ノックアウト）。18Sおよび28SリボソームRNAの移動位置を示してある。どのレーンも負荷がほぼ等しいことは、18S rRNA cDNAプローブを使って証明された。Br, 脳；Lu, 肺；He, 心臓；St, 胃；Sp, 脾臓；Li, 肝臓；Si, 小腸；Ki, 腎臓；Te, 精巣；Ut, 子宮。

【図2】 マウス卵巣における卵巣特異的遺伝子のインサイチュハイブリダイゼーション解析。01-180（図2A～2B）、01-184（図2C～2D）および01-236（図2E～2F）に対するアンチセンスプローブを使ってインサイチュハイブリダイゼーションを行なった。図2A、2Cおよび2Eは卵巣の明視野解析である。図2B、2Dおよび2Fは同じ卵巣切片の暗視野解析である。どの遺伝子も、単層一次卵胞段階（小さい矢印）から始まり胞状卵胞段階（大きい矢印）まで続く卵母細胞における特異的発現を示している。 40

【図3】 マウス卵巣における01-236のインサイチュハイブリダイゼーション解析。プローブ01-236（部分Npm2 cDNA断片）を使ってインサイチュハイブリダイゼーションを行なった。同じ成体卵巣切片中の01-236 mRNAの明視野解析（図3A）および暗視野解析（図3B）。このプローブにより、成長中のすべての卵母細胞で、特異的発現が示される。卵母細胞特異的発現は初期単層一次卵胞（3a型）に初めて認められ、単層3b型卵胞とそれ以降のすべての段階（胞状（an）卵胞を含む）では発現量が多くなる。

【図4】 Npm2 cDNAを表す図。マウスNpm2 cDNA配列（984bp）と、マウス卵巣cDNAライブラリーから単離されたクローンのうちの2つの概略図。元の01-236プローブ（749bp）を一 50



番上に示す。これはNpm2オープンリーディングフレーム全体を包含する。このオープンリーディングフレーム（中実の四角形）は621bpであり、5'UTR配列と3'UTR配列（細い線）はそれぞれ155bpおよび205bpである。ポリA配列は描かれていない。クローン236-1（Npm2）は野生型卵巣cDNAライブラリーから単離され、クローン236-3はGdf9ノックアウト卵巣cDNAライブラリーから単離された。クローン236-3（ポリA配列を除いて984bp）は、クローン263-1（ポリA配列を除いて979bp）より5'末端が4bp、3'末端が1bp長い。

【図5】アフリカツメガエル（配列番号15）、マウス（配列番号6）およびヒト（配列番号9）NPM2タンパク質のアミノ酸配列保存。NCBI blast検索ツールおよびMegalignソフトウェアを使って、マウス（m）、ヒト（h）およびアフリカツメガエルNPM2アミノ酸配列を比較すると、高い一致度（青色で強調したアミノ酸）が明らかになる。アミノ酸の間の空白は整列を助けるためのギャップを示す。保存された二極性核移行シグナル（赤色）、高度に酸性なヒストンおよびプロタミン結合領域（赤色）ならびにいくつかの保存されたカゼインキナーゼII（CK2）およびプロテインキナーゼC（PKC）リン酸化部位（下線を引く「CK」または「PKC」と記す）も特定されている。ヌクレオプラスミン中の保存されていない他の予想リン酸化部位は示していない。

【図6A - B】マウスNpm2遺伝子の構造（図6A）。マウス129/SvEvライブラリーから単離した2つのオーバーラップ組換えラムダクローン（236-13および236-14）を上側に示し、Npm2遺伝子の拡大略図も図示する。中空の四角形は非翻訳領域を表し、中実の黒い四角形はタンパク質コード領域を表す。236-13インサートは約19.0kbであり、236-14インサートは約21.0kbである。コンティグ全体は約37kbである。図に示すように、Npm2遺伝子の9個のエクソンはすべて、一本の6.9kb XbaI（X）断片上に包含される。エクソンおよびイントロンのサイズを下側に示す。略号：B, BamH1；（B），予想されるがマッピングされていないBamH1；（N），ファージクロニング部位のNotI。図6BはヒトNpm2遺伝子の構造を示す。

【図7A - B】マウスNpm2遺伝子（配列番号7）およびアミノ酸配列（配列番号6）。大文字はNpm2 cDNA配列との配列の一致を表し、5'および3'非転写配列ならびにイントロン配列は小文字で示す。予想転写開始コドン、終止コドンおよびポリAデニル化シグナル配列にはすべて下線を引く。左側の数字はアミノ酸を表す。コドン36の下線付き太字「T」、アミノ酸26の太字「c」および3'UTR配列中の下線付き太字「C」は、cDNA配列と遺伝子配列の間の相違を示す。矢印はcDNA配列における01-236断片の開始点と終了点を示している。

【図8】マウスNpm2遺伝子の染色体局在。（上）14番染色体データを示すJackson LaboratoryのT31放射線ハイブリッドデータベースから得た地図。この地図は上端近くにセントロメアを置いて描かれている。隣接する遺伝子座間の距離を、センチレイ（3000）の単位で染色体線の左に示す。いくつかの14番染色体MITマーカーの位置を右側に示す。マウスNpm2遺伝子はD14Mit203とD14Mit32の間に位置する。欠落したタイピングは割り当てが疑わしくない場合は周辺データから推論した。（下）Npm2に連鎖する遺伝子座を含む14番染色体の一部を示すJackson LaboratoryのT31放射線ハイブリッドデータベースから得たハプロタイプ図。遺伝子座は最も近位を上端にしてベストフィット順に挙げられている。黒い四角形はそのマウス断片について陽性と判定されるハイブリッド細胞株を表し、白い四角形は陰性と判定される細胞株を表す。灰色の四角形はタイピングされていない株または不明瞭な株を示す。各ハプロタイプを持つ株の数を、四角形の縦列のそれぞれの下に示す。欠落したタイピングは割り当てが疑わしくない場合は周辺データから推論した。

【図9】マウス卵巣および初期胚中のNpm2 mRNAおよびNPM2タンパク質の解析。プローブ01-236（部分Npm2 cDNA断片）を使ってインサイチュハイブリダイゼーションを行った。同じ成体卵巣切片中の01-236 mRNAの明視野解析（図9A）および暗視野解析（図9B）。（図9C）3型卵胞（矢印）から胞状卵胞までの卵母細胞の核（明赤色）内のNPM2が染色された、5週齢のマウスから得た卵巣の免疫組織化学像。（図9D）黄体形成ホルモン（hCG）で誘発した排卵前GV卵母細胞では、NPM2が細胞質内で一様に染色される（矢印）。LH（hCG）非応答性前胞状卵胞（右上）はNPM2タンパク質が核に局在した卵母細胞を示し続ける。

(図9E)受精後、NPM2は前核に局在し始める。1つの前核(矢印)の形成は形成途中であり、一部のNPM2染色はこの初期単細胞胚の細胞質中に存在し続けている。(図9F)NPM2が細胞質にほとんど残っていない発育の進んだ単細胞胚では前核が強く染色される。NPM2抗体は2細胞胚(図9G)および8細胞胚(図9H)の核も特異的に染色する。

【図10A-B】ヘテロ接合体交雑から得られる子孫の遺伝子型解析およびNpm2のノックアウトを行うための遺伝子ターゲティングコンストラクト。(図10A)エクソン2、エクソン3、およびエクソン4の接合部を欠失させるために使用したターゲティング戦略。PGK-hprtおよびMC1-tk発現カセットを示す。組換えは5'プロンプおよび3'プロンプを使ったサザンブロット解析によって検出した(B, BamHI; Bg, BglII; P, PstI)。(図10B)Npm2<sup>+/+</sup>マウスの交雑によって作出したマウスから単離されたゲノムDNAのサザンブロット解析。DNAをBglIIで消化した場合、3'プロンプでは野生型の7.5kbバンドと突然変異型の10.3kbバンドが確認される。(図10C)DNAをPstIで消化した場合、エクソン2プロンプは野生型の4.5kb断片だけを検出した。

【図11】野生型、Npm2<sup>+/+</sup>およびNpm2<sup>-/-</sup>マウスから得た卵巣の組織学的解析。(図11A~11D)卵母細胞の核内のNpm2が染色された、6週齢のマウスから得られた卵巣の免疫組織化学像(図11Aおよび図11CはNpm2<sup>+/+</sup>卵巣の像;図11Bおよび図11DはNpm2<sup>-/-</sup>卵巣の像)。(図11E~11F)12週齢マウスの野生型卵巣(図11E)およびNpm2<sup>-/-</sup>卵巣(図11F)から得られた、卵巣のPAS(過ヨウ素酸シッフ)/ヘマトキシリン染色像。矢印は大きい胞状卵胞を表す。「CL」は黄体を意味する。

【図12】Npm2<sup>-/-</sup>マウスおよび対照マウスから得た卵子のインビトロ培養およびその受精卵のDNAの蛍光標識。過剰排卵後に未熟マウスの卵管から卵子を単離し、インビトロ培養した。24時間および48時間培養した時点で顕微鏡写真を撮影した。(図12A、12C)野生型マウスから得た卵子の大半は分裂して24時間までに2細胞胚を形成した。一部の2細胞胚は48時間の培養後に4細胞段階まで進行した。(図12B、12D)Npm2<sup>-/-</sup>マウスから得た卵子で2細胞胚に分割したものはごくわずかだった。48時間の培養後に4細胞胚は検出されなかった。Npm2<sup>-/-</sup>マウスからは発生的に異常な胚またはアポトーシスを起こしたらしい胚がいくつか検出された。

【図13】マウス卵巣における01-180の局在。PMSG処理した野生型卵巣(図13Aおよび13B)ならびにGdf9ノックアウト卵巣(図13C~13F)における01-180の発現を、特異的アンチセンスプロンプを使ったインサイチュハイブリダイゼーションによって解析した。野生型卵巣では、初期一次卵胞段階(3a型)から排卵卵胞段階までは01-180遺伝子の発現が検出できたが、原始卵胞では検出できなかった。Gdf9ノックアウト卵巣では、一次卵胞段階での卵胞発育の停止によって単位体積あたりの卵胞数が増加し、より多くの01-180陽性シグナルが各切片に検出された。図13A、13Cおよび13Eは卵巣の明視野解析であり、図13B、13Dおよび13Fは同じ卵巣切片の対応する暗視野解析である。図13Eおよび13Fは図13Cおよび13Dに示したものと同一切片の強拡大像である。

【図14】01-180遺伝子(配列番号11)および01-180偽遺伝子(配列番号12)の構造。01-180偽遺伝子および01-180遺伝子の線図を上側に示し、この直線地図を構築する際に重要だったユニーク制限エンドヌクレアーゼ部位を下側に示す。エクソンとイントロンは同じ縮尺で描かれている。四角形はエクソンを表し、斜線部はタンパク質コード部分を表し、中実部は非翻訳領域を表す。四角形をつなぐ線はイントロンを表す。01-180ps:01-180偽遺伝子;01-180:01-180遺伝子;B:BamHI;S:Sall;X:XhoI。

【図15A-B】01-180遺伝子と01-180偽遺伝子の比較。エクソンの配列、エクソン-イントロン境界および各イントロンのサイズを示す。2つの遺伝子間で異なるヌクレオチドとコンセンサスポリアデニル化配列に下線を引く。翻訳開始コドンおよび停止コドンを太字で示す。大文字:エクソン配列;小文字:イントロン配列。

【図16】01-180遺伝子(A)およびその類縁偽遺伝子(B)に最もよく連鎖するマーカーの位置をセンチモルガン(cM)の単位で表すマウス5番染色体の地図(Jackson Laboratory Bioinformatics Serverで作成されたデータおよび地図)。

【図17】01-180用の遺伝子ターゲティングコンストラクト。エクソン1を欠失させるた

10

20

30

40

50

めに使用したターゲティング戦略。PGK-hprtおよびMC1-tk発現カセットを示す。

【図 1 8】さまざまな組織におけるO1-180 mRNA発現のノーザンブロット解析。

【図 1 9】組換えO1-180のウェスタンブロット解析。

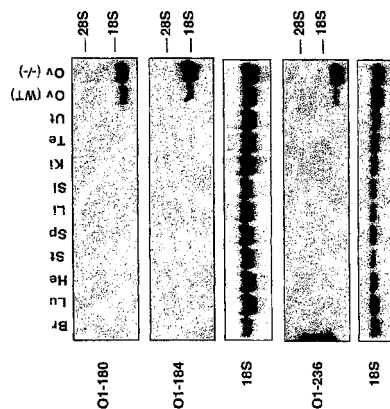
【図 2 0】マウス卵巣中のO1-180の免疫染色。抗O1-180ポリクローナル抗体（ヤギに産生させたもの）をIHCにを使って、マウス卵巣切片におけるO1-180の発現を検出した。図20A～20Dは野生型卵巣である。図20E～図20FはGdf9ノックアウト卵巣である。図20bは正常ヤギ血清を使った陰性対照である。O1-180タンパク質はマウス卵母細胞および接合子の細胞質に特異的に局在したが、この時点後に消失する。染色はO1-180タンパク質の位置を示す。

【図 2 1】O1-190マウス胚のインビトロ培養。図21AはO1-180<sup>+/+</sup>マウスから培養した胚を表し、図21BはO1-180<sup>-/-</sup>マウスから培養した胚を表す。M16培地でのインビトロ培養の3日目に、ほとんどの対照胚は桑実胚段階または胚盤胞段階に進行したが、O1-180ノックアウトマウスの接合子はまだ単細胞または2細胞段階のままだった。

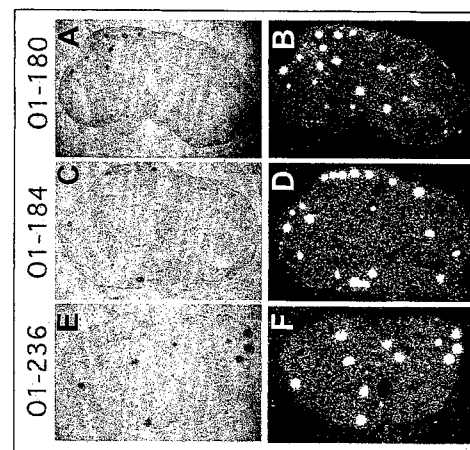
【図 2 2】ヒトO1-180タンパク質とマウスO1-180タンパク質の比較を示す図。相違する残基に下線を引く。これらのタンパク質は91.3%の類似度を持つ。

10

【図 1】

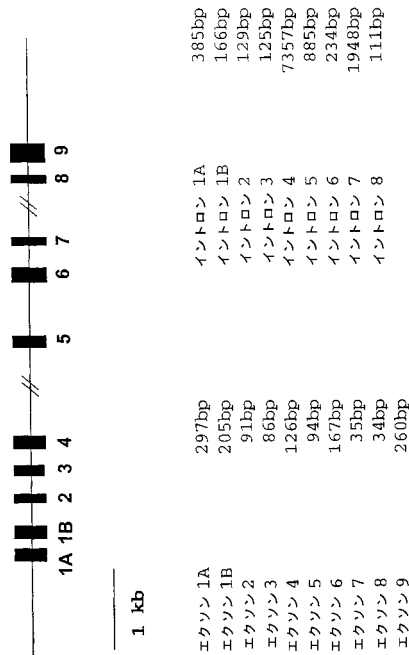


【図 2】





【図 6 B】



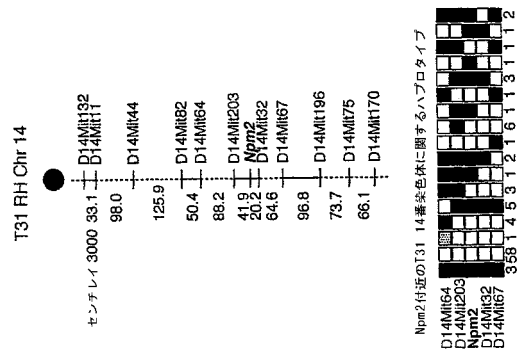
【図 7 A】

マウス Npm2 遺伝子配列  
 acagcaggggtgatgctcagaatcaagtttaacagaggccaggtg  
 ctctagagtaggaggggaltgcacacccccccccctctcttc  
 ccagctcttcaacagcctgtgtgggaagctgaccccttagatggagc  
 cctgaaGCCATATTGAGGACCTGCAGTAGAGGTGGAACCCATGACTGG  
 CAGCGCAgtaagcttgagcagg...イントロン1= 343bp  
 ...cttgcattactcagAACACAGTGATAACAGCTGAGCTCCAAGCA  
 AGGACCCAGGACCTTGCTCACCACAGACATAATCTTCCCCACAACA  
 CCTCCACCAAGCCGCCCTGTAAATCGAC ATG AGT CGC CAC AGC  
 1 M S R H S  
 6 ACC AGC AGC GTG ACC GAA ACC ACA GCA AAA AAC ATG  
 T S S V T E T T A K N M  
 18 CTC TGG Ggtaaggggctaaggtct... イントロン2 = 134bp  
 L W  
 20 ...gtcttcgtgtgcagGT AGT GAA CTC AAT CAG GAA AAG  
 G S E L N Q E K  
 28 CAG ACT TGC ACC TTT AGA GGC CAA TGC GAG AAG AAG  
 Q T C T F R G Q C E K K  
 40 GAC AGC TGT AAA CTC TTG CTC AGC ACGgtgggtgtctccc  
 D S C K L L L S T  
 49 aa... イントロン3 = 92bp ...catcacctttctcagATC  
 I  
 50 TGC CTG GGG GAG AAA GCC AAA GAG GAG GTG AAC CGT  
 C L G E K A K E E V N R  
 62 GTG GAA GTC CTC TCC CAG GAA GGC AGA AAA CCA CCA  
 V E V L S Q E G R K P P  
 74 ATC ACT ATT GCT ACG CTG AAG GCA TCA GTC CTG CCC  
 I T I A T L K A S V L P  
 86 ATGgtgagctctctctctccc... イントロン4 = 2.8kb ...agaa  
 M  
 87 gggggacacagGTC ACT GTG TCA GGT ATA GAG CTT TCT  
 V T V S G I E L S  
 96 CCT CCA GTA ACT TTT CGG CTC AGG ACT GGC TCA GGA  
 P P V T F R L R T G S G

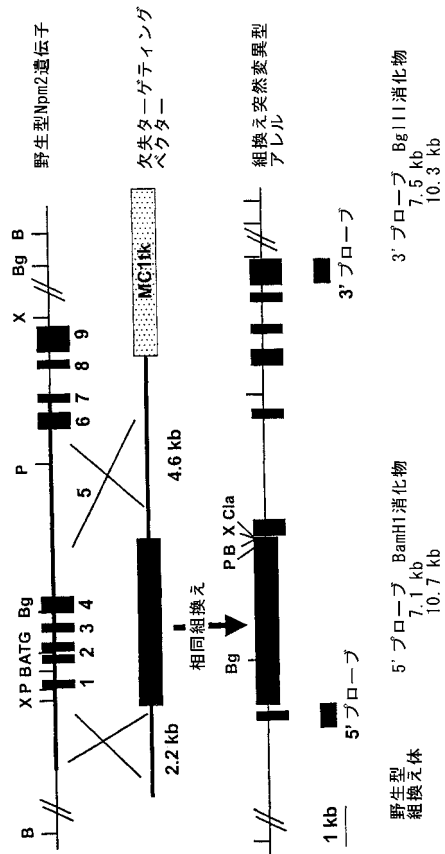
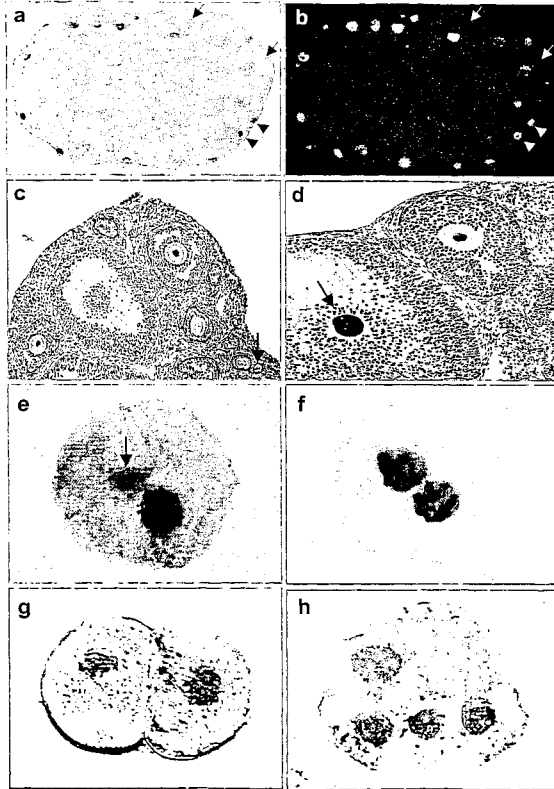
【図 7 B】

108 CCT GTG TTC CTC AGT GGC CTG GAA TGT TAT Ggtaagtt  
 P V F L S G L E C Y  
 gtagcccta...イントロン5 = 1.35kb ...ggctacccatccc  
 118 agAG ACT TCG GAC CTG ACC TGG GAA GAT GAC GAG GAA  
 E T S D L T W E D D E E  
 130 GAG GAG GAA GAG GAG GAG GAA GAG GAT GAA GAT GAG  
 E E E E E E E E D E D E  
 142 GAT GCA GAT ATA TCG CTA GAG GAT ATA CCT GTC AAA  
 D A D I S L E E ! P V K  
 154 CAA GTC AAA AGG GTG GCT CCC CAG AAG CAG ATG AGC  
 Q V K R V A P Q K Q M S  
 166 ATA GCA AAGgtggggganaagaa...イントロン6 = 186bp  
 I A K  
 169 ...tgggtttgtccagAAA AAG AAG GTG GAA AAA GAA  
 K K K V E K E  
 176 GAG GAT GAA ACA GTA GTG AGgtaattcatgcagtt...  
 E D E T V V R  
 イントロン7 = 0.5kb ... ctatccctttccagG CCC AGC  
 183 P S  
 185 CCT CAG GAC AAG AGT CCC TGG AAG AAG gtagcantaag  
 P Q D K S P W K K  
 194 aag...イントロン8 = 92bp ...ctcttatctgcacagGAG  
 E  
 195 AAA TCT ACA CCC AGA GCA AAG AAG CCA GTG ACC AAG  
 K S T P R A K K P V T K  
 207 AAA TGA CCTCATCTTAGCATCTTCTGCGTCCAAGGCAGGATGTCCA  
 K \*  
 GCAAGCTGTGTTCTGGTGACAGGTGCCAGCCCCACCCCTAGTCTGAA  
 TGTAAATAAGGTGGTGTGGCTGTAAACCTGTAAACCCAGCCCTCCAGTIT  
 CCGGAGGTITTTTGGTGAAGAGCCCCCAGCAAGTTTCGCTAGGGCCACA  
 ATAAATTTGCAATGATCAGGacccctctctgctccctccctccggaat  
 gggctcctcgtctgcatagctcatgtgccagcagagggaacc  
 acgagcaagaaccagccccatgt

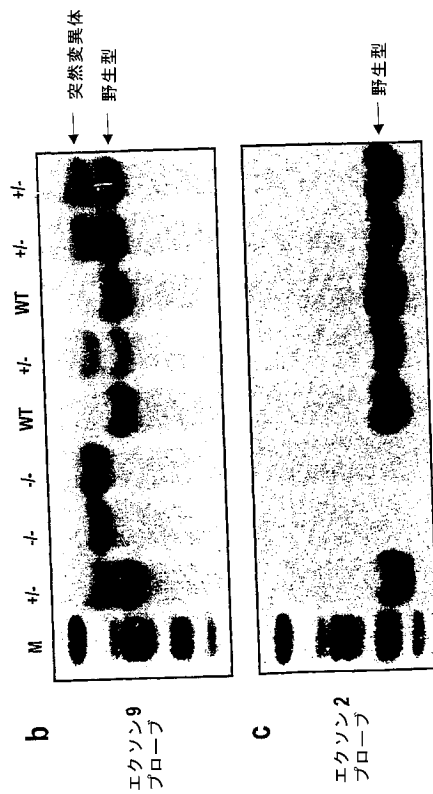
【図 8】



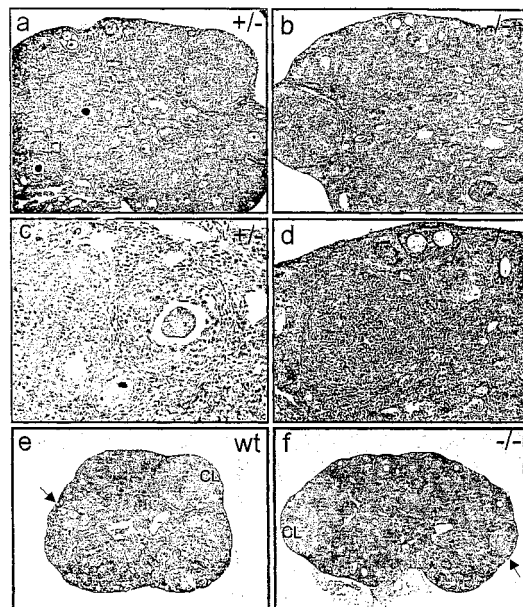
【 図 1 0 A 】



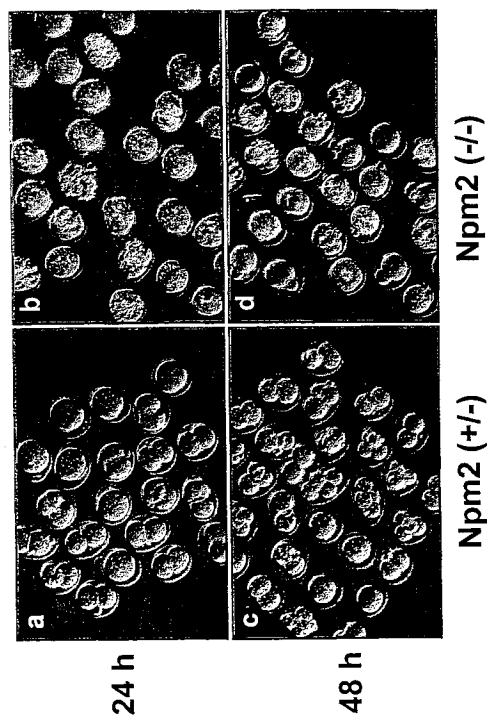
【 図 1 0 B 】



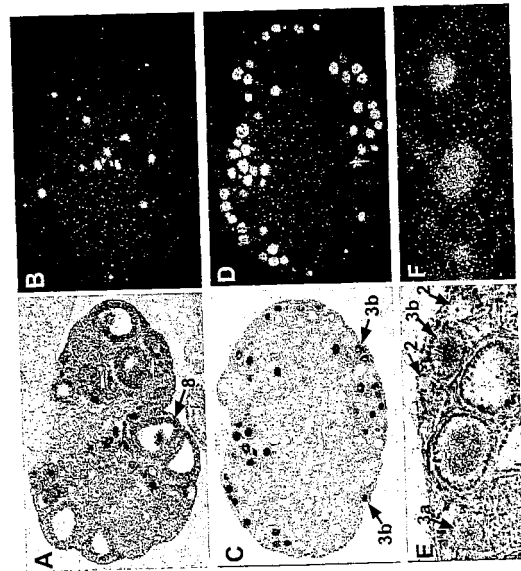
【 図 1 1 】



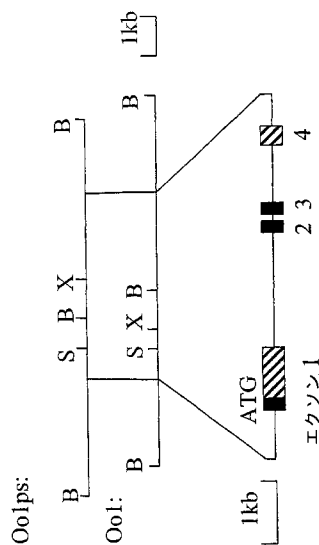
【 図 1 2 】



【 図 1 3 】



【 図 1 4 】



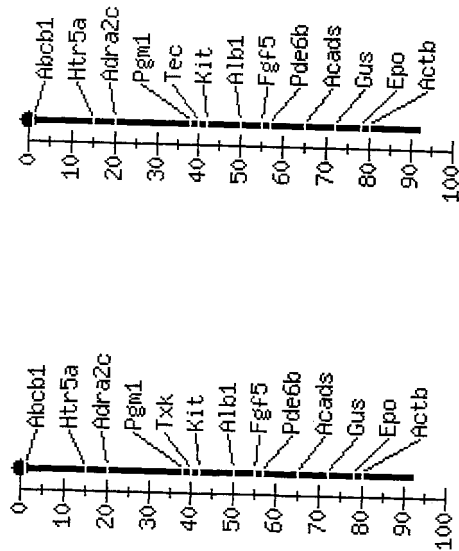
【 図 1 5 A 】

Oo1 通配子 GGC GGCGGAGGCGCGGAGCGACCCATGTTCCGGGAGACAGTTCCACCCCTGCGCGATCCTTATCCG 70  
 psOo1 通配子 GGC GGCGGAGGCGCGGAGCGACCCATGTTCCGGGAGAGACAGTTCCACCCCTGCGCGATCCTTATCCG  
 Oo1 通配子 CAGGCCACCAAAAGCCGGGATGCGTGGAGGTTCCGAGCCAGGCGGCGGAGCGCGCGCGCTCTCTCC 140  
 psOo1 通配子 CAGGCCACCAAAAGCCGGGATGCGTGGAGGTTCCGAGCCAGGCGGCGGAGCGCGCGCGCTCTCTCC  
 Oo1 通配子 TCCCCGGCTACAGACAGCTCATGCGCGCGGAGTACGTCCAGCCACAGCGCGGAGCGCGCGCTCATGCGCT 210  
 psOo1 通配子 TCCCCGGCTACAGACAGCTCATGCGCGCGGAGTACGTCCAGCCACAGCGCGGAGCGCGCGCTCATGCGCT  
 Oo1 通配子 GCTGTCGCGGATGGGTCCCGGTGCGTCCAGCAGCGGTGACGCTGCGGTGCGAGTGAACCGCGCGCGGAG 280  
 psOo1 通配子 GCTGTCGCGGATGGGTCCCGGTGCGTCCAGCAGCGGTGACGCTGCGGTGCGAGTGAACCGCGCGCGGAG  
 Oo1 通配子 GCCTCGGTGAGTGTTCCTACCTGCGCGCGCGAGCGCTGAGCGGTGCGAGCGCGCGCGCGCGCGCGCG 350  
 psOo1 通配子 GCCTCGGTGAGTGTTCCTACCTGCGCGCGCGAGCGCTGAGCGGTGCGAGCGCGCGCGCGCGCGCGCG  
 Oo1 通配子 GATCGGGTTCCTGTCACCGCGGTGCG 420  
 psOo1 通配子 GATCGGGTTCCTGTCACCGCGGTGCG  
 Oo1 通配子 CCGGTTCTGCTGCGTACCTTCTGCGCGCTGCT 490  
 psOo1 通配子 CCGGTTCTGCTGCGTACCTTCTGCGCGCTGCT  
 Oo1 通配子 ACGAGGGAGAGGGGAGCGCGCGCATCTCGGGACCCCGGAAACCGAGCGGAGAGGTGCGCGCGAGGA 560  
 psOo1 通配子 ACGAGGGAGAGGGGAGCGCGCGCATCTCGGGACCCCGGAAACCGAGCGGAGAGGTGCGCGCGAGGA  
 Oo1 通配子 AAGCGGTCCCCAGCGCGGAGCGGAGGCGGATTTCAAGCTGCGAGGCGAGCGCGGCTGGGAGCAGCA 630  
 psOo1 通配子 AAGCGGTCCCCAGCGCGGAGCGGAGGCGGATTTCAAGCTGCGAGGCGAGCGCGGCTGGGAGCAGCA  
 Oo1 通配子 GCCACCAACCGGAGCGGAGCAGTGTGGCGCGGAGTCTGAGCTGCGAGCGGAGCGGAGCGGATGCTCT 700  
 psOo1 通配子 GCCACCAACCGGAGCGGAGCAGTGTGGCGCGGAGTCTGAGCTGCGAGCGGAGCGGAGCGGATGCTCT  
 Oo1 通配子 GCCGAGAGATGCTCAGGACCGCGGTATTCGGATGCGCGCTGCGAGCAGGCGTCCCGCGGAGAGCGG 770  
 psOo1 通配子 GCCGAGAGATGCTCAGGACCGCGGTATTCGGATGCGCGCTGCGAGCAGGCGTCCCGCGGAGAGCGG  
 Oo1 通配子 AGCAGGACAGGAGCGCGCTGCGGTATTCGGATGCGCGCTGCGAGCAGGCGTCCCGCGGAGAGCGG 799  
 psOo1 通配子 AGCAGGACAGGAGCGCGCTGCGGTATTCGGATGCGCGCTGCGAGCAGGCGTCCCGCGGAGAGCGG  
 Oo1 通配子 TglttCagTTCTTAGAGCAGAGTACGGCTACTATCTACTGCAAGGACTGCAAAATCCGCTGGGAGAGCGCT 863  
 psOo1 通配子 TglttCagTTCTTAGAGCAGAGTACGGCTACTATCTACTGCAAGGACTGCAAAATCCGCTGGGAGAGCGCT  
 Oo1 通配子 ATGTGTGTGTGTGTGCGAGGACCAAGTAAAGTAAAGAGACAGCTG... (1.8kb)... taacctgc 892  
 psOo1 通配子 ATGTGTGTGTGTGTGCGAGGACCAAGTAAAGTAAAGAGACAGCTG... (1.8kb)... taacctgc  
 Oo1 通配子 CGCAGGTGTACTTCAAAAGTCTGCGGAGTGTGTGAGAAATCTCAACACCTTACAGAGTGAAGGAGCT 957  
 psOo1 通配子 CGCAGGTGTACTTCAAAAGTCTGCGGAGTGTGTGAGAAATCTCAACACCTTACAGAGTGAAGGAGCT  
 Oo1 通配子 CACCTGTCAAgttaacccaacgltt... (878bp)... gctcaggttticagagttgttAAAGAGCT 982  
 psOo1 通配子 CACCTGTCAAgttaacccaacgltt... (878bp)... gctcaggttticagagttgttAAAGAGCT

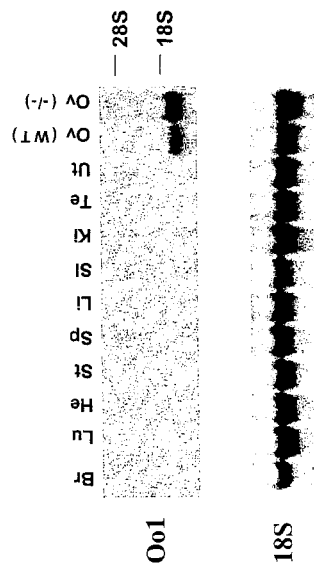
【図 15 B】

Oo1 塩基序 AGATGTGCTGCGCCAGTCAGACTTCGCCACGTGACCGTTAAAGCGCCCATCGGCAAGACTTGTGTGGGA 1052  
 psOo1 塩基序 AGATGTGCTGCGCCAGTCAGACTTCGCCACGTGACCGTTAAAGCGCCCATCGGCAAGACTTGTGTGGGA  
 Oo1 塩基序 GATGCAAGGACAAATGCTTGTCTTCCGACAGCAGCTTCAGCTTCAATACATCATTTAAGTGAGAGTACGA 1122  
 psOo1 塩基序 GATGCAAGGACAAATGCTTGTCTTCCGACAGCAGCTTCAGCTTCAATACATCATTTAAGTGAGAGTACGA  
 Oo1 塩基序 AACGTTTCTGCTAGATGGGGCTAATGGAATGGACAGTGAAGCTTTCCTCCCTCTTCCCTCTTCCCAATTTTC 1192  
 psOo1 塩基序 AACGTTTCTGCTAGATGGGGCTAATGGAATGGACAGTGAAGCTTTCCTCCCTCTTCCCTCTTCCCAATTTTC  
 Oo1 塩基序 CAAATCTTTCATGACAGACAGTGTACTTTGGATATAAAGCCCTGTGAATAAAGGTATTGCAAAACA 1257  
 psOo1 塩基序 CAAATCTTTCATGACAGACAGTGTACTTTGGATATAAAGCCCTGTGAATAAAGGTATTGCAAAACA

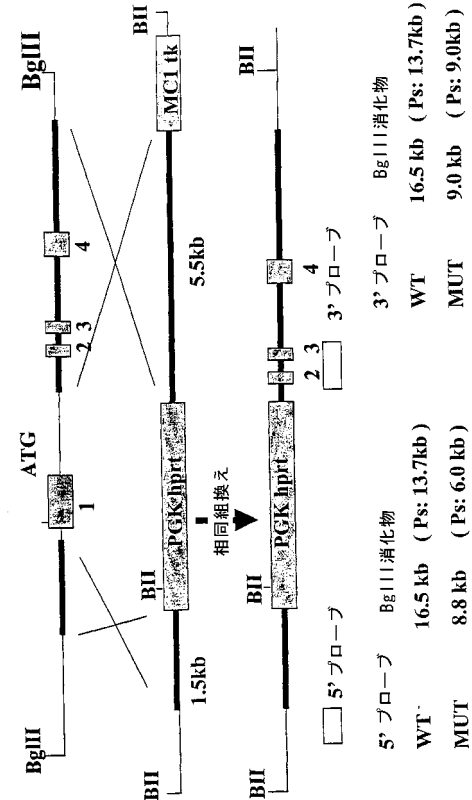
【図 16】



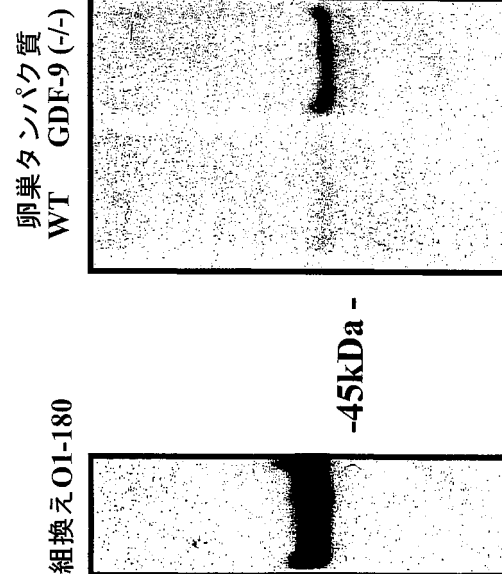
【図 18】



【図 17】

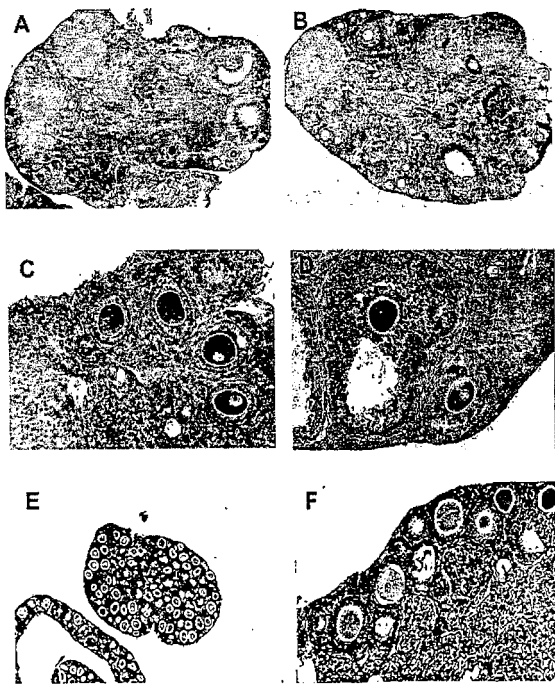


【図 19】

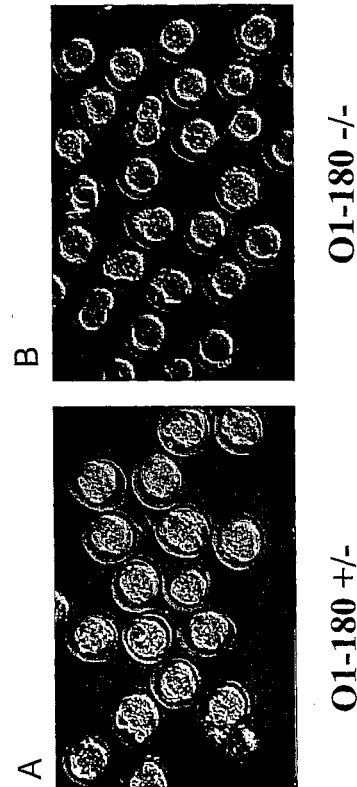




【図 20】



【図 21】



【図 22】

ヒトO1-180のC末端 : FLEQKYGYH CKDCNIRWES AYVWCQGTN  
 マウスO1-180のC末端 : FLEQKYGYH CKDCNIRWES AYVWCQGTN  
 ヒトO1-180のC末端 : KYVFKQFCRT COKSYNPIRV EDITCQSCQ  
 マウスO1-180のC末端 : KYVFKQFCRV CEKSYNPIRV EDITCQSCRR  
 ヒトO1-180のC末端 : TRCSCPVKLR HVDPKPRHQ DLGCRCKGR  
 マウスO1-180のC末端 : TRCACPVRER HVDPKPRHQ DLGCRCKGR  
 ヒトO1-180のC末端 : LSCDSTFSFK YII  
 マウスO1-180のC末端 : LSCDSTFSFK YII

## 【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

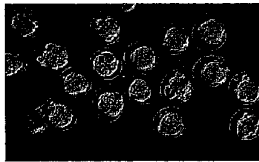
(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
7 November 2002 (07.11.2002)

PCT

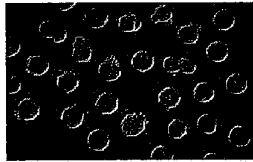
(10) International Publication Number  
**WO 02/088314 A2**

- (51) International Patent Classification: C12N (74) Agent: ACOSTA, Melissa, W.; Fulbright & Jaworski, L.L.P., 1301 McKinney, Suite 5100, Houston, TX 77010-3095 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US02/13245
- (22) International Filing Date: 26 April 2002 (26.04.2002) (81) Designated States (national): AI, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LI, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PA, PE, PI, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 09/844,864 27 April 2001 (27.04.2001) US (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM, KI, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) Applicants (for all designated States except US): BAYLOR COLLEGE OF MEDICINE [US/US]; Associate General Counsel, One Baylor Plaza, Suite 106A, Houston, TX 77030 (US); WYETH [US/US]; Five Giraldi Farms, Madison, NJ 07940 (US).
- (72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): MATZUK, Martin, M. [US/US]; 2926 Rassett Place West, Pearland, TX 77584 (US); WANG, Pei [CN/US]; 5319 Arcadia Avenue, Houston, TX 77004 (US); BAI, Yuchen [CN/US]; Wyeth, 500 Arcola Road, Rm. S2316, Collegeville, PA 19426 (US); WU, Xuemei [CN/US]; Apt. 1038, 4010 Linkwood Drive, Houston, TX 77025 (US).
- Published: without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: OVARY-SPECIFIC GENES AND PROTEINS

*In vitro* Culture of O1-180 Mouse Embryos

O1-180 +/-



O1-180 -/-

(57) Abstract: The present invention relates generally to ovary-specific genes (O1-180, O1-184 and O1-236) and the proteins they encode. Also provided are methods for detecting cell proliferative or degenerative disorders in reproductive tissues. Yet further, the invention provides methods for screening of compounds that interact and/or modulate the expression or activity of the ovary-specific genes. These compounds are possible contraceptive agents and/or fertility agents.

WO 02/088314 A2

WO 02/088314

PCT/US02/13245

**OVARY-SPECIFIC GENES AND PROTEINS**

[0001] This application is a continuation-in-part of U.S. Application 09/844,864, which was filed on April 27, 2001, which is a continuation-in-part application of International Application Number PCT/US99/25209 filed October 28, 1999, which is an international application claiming priority to U.S. Provisional Application Number 60/106,020 filed October 28, 1998.

**BACKGROUND OF THE INVENTION****A. Field of the Invention**

[0002] The present invention relates generally to ovary-specific genes and the proteins they encode.

**B. Description of Related Art**

[0003] Reproductive development and function are complex processes involving both genetically-determined and physiological events. Identification of the critical protein products of genes involved in these processes is necessary to characterize how these processes are regulated. Although important molecular events occur during the early phases of mammalian oogenesis and folliculogenesis, to date, few "candidate" regulatory molecules have been identified and characterized thoroughly. Several studies have suggested that both endocrine factors, such as luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH) from the pituitary, as well as paracrine factors secreted from the oocyte influence folliculogenesis. FSH and LH are known to bind to granulosa and thecal cells which in turn are required for oocyte growth and maturation and maintenance of oocyte meiotic competence. Likewise, oocytes may secrete factors which are necessary for normal granulosa cell and thecal cell function. Because oocyte growth is coordinated with the development and growth of the surrounding somatic cells (*i.e.*, granulosa cells initially and thecal cells later), understanding the molecular events at early stages will give important clues about the paracrine factors mediating the reciprocal interactions between oocytes and somatic cells, the development of competence for trophic hormone stimulation, and the process of follicular recruitment.

[0004] Disruption of the hypothalamic-pituitary-gonadal reproductive axis by administration of steroids containing synthetic estrogens and progestins has been one of the

WO 02/088314

PCT/US02/13245

oldest methods of hormonal contraception. However, the latest report of the Institute of Medicine emphasizes the importance of developing strategies for new contraceptives. According to the report, some of the long-term contraceptive strategies for women include inhibition of ovulation, prevention of fertilization, or blocking of implantation of a fertilized egg into the uterine lining. Furthermore, infertility affects ~15% of couples, and in ~40% of the cases, the female is believed to be the sole cause of the infertility. Thus, it is critical to identify novel ovary-specific gene products which could be potential targets for new contraceptive agents.

[0005] One function of the ovary is to produce an oocyte that is fully capable of supplying all the necessary proteins and factors for fertilization and early embryonic development. Oocyte-derived mRNA and proteins are necessary for the removal of the sperm nuclear envelope, the decondensation of the sperm nucleus (including the removal of protamines), the assembly of histones on the sperm DNA and chromatin condensation, the completion of oocyte meiotic maturation and extrusion of the second polar body, the formation of male and female pronuclei, the fusion of male and female pronuclei, the replication of DNA, and the initiation of zygote and early embryonic cleavages [reviewed in (Perreault, 1992)]. Oocyte-derived factors are necessary since the sperm contains mainly DNA (*i.e.*, no cytoplasm or nucleoplasm), and many of the factors necessary for early post-fertilization events in mammals are acquired during oocyte meiotic maturation (McLay and Clarke, 1997). These oocyte proteins are predicted to be highly conserved through evolution since oocytes can efficiently remodel heterologous sperm or somatic cell nuclei into pronuclei (Perreault, 1992). Although histones are involved in the modification of the sperm chromatin to resemble that of a somatic cell, the other non-histone proteins involved in these processes are unknown in mammals. In *Xenopus laevis*, a key factor in sperm decondensation is nucleoplasmin which was isolated and cloned over a decade ago (Burglin *et al.*, 1987; Dingwall *et al.*, 1987). Sperm chromatin decondensation occurs after a spermatozoon enters an egg. In *Xenopus laevis*, although reduction of the protamine disulfide bonds by ooplasmic glutathione is important, nucleoplasmin (also called nucleoplasmin A or Xnpm2) is necessary and sufficient to initiate the decondensation of sperm nuclei (Philpott *et al.*, 1991). Nucleoplasmin, an acidic, thermostable protein, is the most abundant protein in the nucleus of *Xenopus laevis* oocytes and eggs, making up 7-10% of the total nuclear protein (Krohne and Franke, 1980a; Mills *et al.*, 1980). After germinal vesicle breakdown, nucleoplasmin [present in the egg nucleoplasm but not bound to DNA (Mills *et al.*, 1980)], is released into the ooplasm where it functions to bind protamines

WO 02/088314

PCT/US02/13245

tightly and strip them from the sperm nucleus within 5 minutes of sperm entry, resulting in sperm decondensation (Ohsumi and Katagiri, 1991; Philpott and Leno, 1992; Philpott *et al.*, 1991). This process allows egg histones to subsequently bind the sperm DNA. Immunodepletion of nucleoplasmin from egg extracts prevents sperm decondensation (Philpott *et al.*, 1991). Direct interaction of nucleoplasmin with protamine was observed in *in vitro* experiments, which suggest that the nucleoplasmin is bound to protamine in a 1:1 ratio and that the polyglutamic acid tract in nucleoplasmin plays a critical role for binding to protamine (Iwata *et al.*, 1999). Interestingly, injection of sperm DNA into oocyte nuclei, male or female pronuclei of fertilized eggs, or nuclei of 2 cell embryos leads to sperm decondensation (Maeda *et al.*, 1998), suggesting that nucleoplasmin is functional at all of these stages. Nucleoplasmin can also interact with histones as a pentamer (Eamshaw *et al.*, 1980; Laskey *et al.*, 1993). Nucleoplasmin binds specifically to histones H2A and H2B and along with the proteins N1/N2 that bind histones H3 and H4, can promote nucleosome assembly onto DNA (Dilworth *et al.*, 1987; Laskey *et al.*, 1993). Thus, these observations suggest that during oogenesis and during oogenesis and at fertilization, the oocyte-derived nucleoplasmin interacts with the female pronucleus and male pronucleus, interacts with histones, and is required in some way for chromatin assembly. (Laskey *et al.*, 1993; Philpott *et al.*, 1991). Although "ubiquitous" proteins with low homology to nucleoplasmin have been cloned in mammals and *Drosophila* (Chan *et al.*, 1989; Crevel *et al.*, 1997; Ito *et al.*, 1996; MacArthur and Shackleford, 1997b; Schmidt-Zachmann and Franke, 1988), an oocyte-equivalent ortholog in mammals had not yet been identified.

[0006] The basic functional unit within the ovary is the follicle, which consists of the oocyte and its surrounding somatic cells. Fertility in female mammals depends on the ability of the ovaries to produce Graafian (pre-ovulatory) (pre-ovulatory) follicles, which ovulate fertilizable oocytes at mid-cycle (Erickson and Shimasaki, 2000). This process, termed folliculogenesis, requires a precise coordinate regulation between extraovarian and intraovarian factors (Richards *et al.*, 1995). Compared to the knowledge of extraovarian regulatory hormones at the levels of the hypothalamus (*i.e.*, GnRH) and anterior pituitary (*i.e.*, FSH and LH), little is known about paracrine and autocrine factors within the ovaries, though oocyte-somatic cell communication has been long recognized as important (Falck, 1959). Accumulating evidence shows that factors secreted by the oocyte promote the proliferation of surrounding granulosa cells, and inhibit premature luteinization of these cells during folliculogenesis (El-Fouly *et al.*, 1970; Channing, 1970). Oocyte factors have been implicated in controlling granulosa cell

WO 02/088314

PCT/US02/13245

synthesis of hyaluronic acid, urokinase plasminogen activator (uPA), LH receptor, steroids and prostaglandins and prostaglandins (El-Fouly *et al.*, 1970; Nekola and Nalbandov, 1971; Salustri *et al.*, 1985; Vanderhyden *et al.*, 1993; Eppig *et al.*, 1997a, b).

[0007] Several novel regulatory proteins have been recently discovered within oocytes. Growth differentiation factor 9 (GDF-9 or *Gdf9*), a member of transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) superfamily, is one of the most important signaling factors. Oocyte expression of GDF-9 begins at the primary follicle stage, and persists through ovulation in the mouse (McGrath *et al.*, 1995; Elvin *et al.*, 2000). Female *Gdf9* knockout mice are infertile due to a block of folliculogenesis at the type 3b (primary) follicle stage, accompanied by defects in granulosa cell growth and differentiation, theca cell formation, and oocyte meiotic competence (Dong *et al.*, 1996; Carabatsos *et al.*, 1998, Elvin *et al.*, 1999A). Also, recombinant GDF-9 affects the expression of the genes encoding hyaluronan synthase 2 (Has2), cyclooxygenase 2 (Cox2), steroid acute regulatory protein (StAR), the prostaglandin E2 receptor EP2, pentarixin 3, LH receptor and uPA (Elvin *et al.*, 1999B, Elvin *et al.*, 2000).

[0008] To identify key proteins in the hypothalamic-pituitary-gonadal axis, several important knockout mouse models have been generated, including four which have ovarian defects. Mice lacking gonadal/pituitary peptide inhibin have secondary infertility due to the onset of ovarian or testicular tumors which appear as early as 4 weeks of age (Matzuk, *et al.*, 1992). Mice lacking activin receptor type II (*Acr2*) survive to adulthood but display reproductive defects. Male mice show reduced testes size and demonstrate delayed fertility (Matzuk, *et al.*, 1995). In contrast, female mice have a block in folliculogenesis at the early antral follicle stage leading to infertility. Consistent with the known role of activins in FSH homeostasis, both pituitary and serum FSH levels are dramatically reduced in these *Acr2* knockout mice. Female mice lacking FSH, due to a mutation in the FSHbeta gene, are infertile (Kumar *et al.*, 1997). However, these mice have an earlier block in folliculogenesis prior to antral follicle formation. Thus, FSH is not required for formation of a multi-layer pre-antral follicle, but it is required for progression to antral follicle formation. Finally, growth differentiation factor 9 (*Gdf9*) knockout mice have been used to determine at which stage in follicular development GDF-9 is required (Dong *et al.*, 1996). Within the ovary, expression of *Gdf9* mRNA is limited to the oocyte and is seen at the early one-layer primary follicle stage and persists through ovulation. Absence of GDF-9 results in ovaries that fail to demonstrate any

WO 02/088314

PCT/US02/13245

normal follicles beyond the primary follicle stage. Although oocytes surrounded by a single layer of granulosa cells are present and appear normal histologically, no normal two-layered follicles are present. Follicles beyond the one-layer stage are abnormal, contain atypical granulosa cells, and display asymmetric growth of these cells. Furthermore, as determined by light and electron microscopy, a thecal cell layer does not form in these *Gdf9* knockout ovaries (Dong *et al.*, 1996; Elvin *et al.*, 1999). Thus, in contrast to kit ligand and other growth factors which are synthesized by the somatic cells and influence oocyte growth, GDF-9 functions in the reciprocal manner as an oocyte-derived growth factor which is required for somatic cell function.

#### BRIEF SUMMARY OF THE INVENTION

**[0009]** The present invention provides three ovary-specific and oocyte-specific polynucleotide sequences, O1-180 (SEQ.ID.NO.1, SEQ.ID.NO.11, SEQ.ID.NO.12, SEQ.ID.NO.13), O1-184 (SEQ.ID.NO.3) and O1-236 (SEQ.ID.NO.5, SEQ.ID.NO.7, SEQ.ID.NO.8; SEQ.ID.NO.10, and SEQ.ID.NO.14), the protein products they encode, fragments and derivatives thereof, and antibodies which are immunoreactive with these protein products. These genes and their protein products appear to relate to various cell proliferative or degenerative disorders, especially those involving ovarian tumors, such as germ cell tumors and granulosa cell tumors, or infertility, such as premature ovarian failure.

**[0010]** Thus, in one embodiment, the invention provides methods for detecting cell proliferative or degenerative disorders of ovarian origin and which are associated with O1-180, O1-184 or O1-236. In another embodiment, the invention provides method of treating cell proliferative or degenerative disorders associated with abnormal levels of expression of O1-180, O1-184 or O1-236, by suppressing or enhancing their respective activities.

**[0011]** In a specific embodiments, the present invention provides a pharmaceutical composition comprising a modulator of O1-180, O1-184 and/or O1-236 expression dispersed in a pharmaceutically acceptable carrier. The modulator may suppress or enhance transcription of an O1-180, O1-184 and/or O1-236 gene. The modulator may be a polypeptide sequence, a protein, a small molecule, or a polynucleotide sequence. Specifically, the polynucleotide sequence is DNA or RNA. In further embodiments, the polynucleotide sequence is comprised in an expression vector operatively linked to a promoter.

WO 02/088314

PCT/US02/13245

[0012] A further embodiment of the present invention is a pharmaceutical composition comprising a modulator of O1-180, O1-184 and/or O1-236 activity dispersed in a pharmaceutically acceptable carrier. The composition may inhibit or stimulate O1-180, O1-184 and/or O1-236 activity. The composition may be a protein, polypeptide sequence, small molecule, or polynucleotide sequence.

[0013] Another embodiment of the present invention is a method of modulating contraception comprising administering to an animal an effective amount of a modulator of O1-180, O1-184 and/or O1-236 activity dispersed in a pharmacologically acceptable carrier, wherein said amount is capable of decreasing conception. The animal may be a male or a female.

[0014] A further embodiment is a method of enhancing fertility comprising administering to an animal an effective amount of a modulator of O1-180, O1-184 and/or O1-236 activity dispersed in a pharmacologically acceptable carrier, wherein said amount is capable of increasing conception.

[0015] Yet further, another embodiment is a method of screening for a modulator of O1-180, O1-184 and/or O1-236 activity comprising the steps of: providing a cell expressing an O1-180, O1-184 and/or O1-236 polypeptide; contacting said cell with a candidate modulator; measuring O1-180, O1-184 and/or O1-236 expression; and comparing the O1-180, O1-184 and/or O1-236 expression in the presence of the candidate modulator with the expression of O1-180, O1-184 and/or O1-236 expression in the absence of the candidate modulator; wherein a difference in the expression of O1-180, O1-184 and/or O1-236 in the presence of the candidate modulator, as compared with the expression of O1-180, O1-184 and/or O1-236 in the absence of the candidate modulator, identifies the candidate modulator as a modulator of O1-180, O1-184 and/or O1-236 expression.

[0016] A specific embodiment of the present invention is a method of identifying compounds that modulate the activity of O1-180, O1-184 and/or O1-236 comprising the steps of obtaining an isolated O1-180, O1-184 and/or O1-236 polypeptide or functional equivalent thereof; admixing the O1-180, O1-184 and/or O1-236 polypeptide or functional equivalent thereof with a candidate compound; and measuring an effect of said candidate compound on the activity of O1-180, O1-184 and/or O1-236.



WO 02/088314

PCT/US02/13245

**[0017]** Another embodiment is method of screening for a compound which modulates the activity of O1-180, O1-184 and/or O1-236 comprising exposing O1-180, O1-184 and/or O1-236 or a O1-180, O1-184 and/or O1-236 binding fragment thereof to a candidate compound; and determining whether said compound binds to O1-180, O1-184 and/or O1-236 or the O1-180, O1-184 and/or O1-236 binding partner thereof; and further determining whether said compound modulates O1-180 or the O1-180 interaction with a binding partner.

**[0018]** Yet further, another embodiment is a method of screening for an interactive compound which binds with O1-180, O1-184 and/or O1-236 comprising exposing a O1-180, O1-184 and/or O1-236 protein, or a fragment thereof to a compound; and determining whether said compound bound to the O1-180, O1-184 and/or O1-236.

**[0019]** Another embodiment is a method of identifying a compound that effects O1-180, O1-184 and/or O1-236 activity comprising providing a group of transgenic animals having (1) a regulatable one or more O1-180, O1-184 and/or O1-236 protein genes, (2) a knock-out of one or more O1-180, O1-184 and/or O1-236 protein genes, or (3) a knock-in of one or more O1-180, O1-184 and/or O1-236 protein genes; providing a second group of control animals respectively for the group of transgenic animals; and exposing the transgenic animal group and control animal group to a potential O1-180, O1-184 and/or O1-236-modulating compounds; and comparing the transgenic animal group and the control animal group and determining the effect of the compound on one or more proteins related to infertility or fertility in the transgenic animals as compared to the control animals.

**[0020]** In specific embodiments, the present invention provides a method of detecting a binding interaction of a first peptide and a second peptide of a peptide binding pair, comprising culturing at least one eukaryotic cell under conditions suitable to detect the selected phenotype; wherein the cell comprises; a nucleotide sequence encoding a first heterologous fusion protein comprising the first peptide or a segment thereof joined to a transcriptional activation protein DNA binding domain; a nucleotide sequence encoding a second heterologous fusion protein comprising the second peptide or a segment thereof joined to a transcriptional activation protein transcriptional activation domain; wherein binding of the first peptide or segment thereof and the second peptide or segment thereof reconstitutes a transcriptional activation protein; and a reporter element activated under positive transcriptional control of the reconstituted transcriptional activation protein, wherein expression of the reporter element

WO 02/088314

PCT/US02/13245

produces a selected phenotype; detecting the binding interaction of the peptide binding pair by determining the level of the expression of the reporter element which produces the selected phenotype; wherein said first or second peptide is an O1-180, O1-184 and/or O1-236 peptide and the other peptide is a test peptide, preferably selected peptides/proteins present in a reproductive tissue. In specific embodiments the reproductive tissue is an ovary or testis. Other reproductive tissues may also include the uterus, vagina, oviduct, cervix, gonads, vas deferens, prostate, seminal vesicles and epididymis.

[0021] A further embodiment is a rescue screen for detecting the binding interaction of a first peptide and a second peptide of a peptide binding pair, comprising: culturing at least one eukaryotic cell under conditions to detect a selected phenotype or the absence of such phenotype, wherein the cell comprises; a nucleotide sequence encoding a first heterologous fusion protein comprising the first peptide or a segment thereof joined to a DNA binding domain of a transcriptional activation protein; a nucleotide sequence encoding a second heterologous fusion protein comprising the second peptide or a segment thereof joined to a transcriptional activation domain of a transcriptional activation protein; wherein binding of the first peptide or segment thereof and the second peptide or segment thereof reconstitutes a transcriptional activation protein; and a reporter element activated under positive transcriptional control of the reconstituted transcriptional activation protein, wherein expression of the reporter element prevents exhibition of a selected phenotype; detecting the ability of the test peptide to interact with O1-180, O1-184 and/or O1-236 by determining whether the test peptide affects the expression of the reporter element which prevents exhibition of the selected phenotype, wherein said first or second peptide is an O1-180, O1-184 and/or O1-236 peptide and the other peptide is a test peptide, preferably selected peptides/proteins present in a reproductive tissue. In specific embodiments, the reproductive tissue is an ovary or testis.

[0022] Yet further, another embodiment is a method of identifying binding partners for O1-180, O1-184 and/or O1-236 comprising the steps of: exposing the protein to a potential binding partner; and determining if the potential binding partner binds to O1-180, O1-184 and/or O1-236.

[0023] The present invention provides key *in vitro* and *in vivo* reagents for studying ovarian development and function. The possible applications of these reagents are far-reaching, and are expected to range from use as tools in the study of development to therapeutic

WO 02/088314

PCT/US02/13245

reagents against cancer. The major application of these novel ovarian gene products is to use them as reagents to evaluate potential contraceptives to block ovulation in women in a reversible or irreversible manner. It will also be expected that these novel ovarian gene products will be useful to screen for genetic mutations in components of these signaling pathways that are associated with some forms of human infertility or gynecological cancers or other cancers associated with reproductive tissues. In addition, depending on the phenotypes of humans with mutations in these genes or signaling pathways, the inventors may consider using these novel ovarian gene products as reagent tools to generate a number of mutant mice for the further study of oogenesis, folliculogenesis, and/or early embryogenesis as maternal effect genes. Such knockout mouse models will provide key insights into the roles of these gene products in human female reproduction and permit the use of these gene products as practical reagents for evaluation of new contraceptives.

[0024] The foregoing has outlined rather broadly the features and technical advantages of the present invention in order that the detailed description of the invention that follows may be better understood. Additional features and advantages of the invention will be described hereinafter which form the subject of the claims of the invention. It should be appreciated by those skilled in the art that the conception and specific embodiment disclosed may be readily utilized as a basis for modifying or designing other structures for carrying out the same purposes of the present invention. It should also be realized by those skilled in the art that such equivalent constructions do not depart from the spirit and scope of the invention as set forth in the appended claims. The novel features which are believed to be characteristic of the invention, both as to its organization and method of operation, together with further objects and advantages will be better understood from the following description when considered in connection with the accompanying figures. It is to be expressly understood, however, that each of the figures is provided for the purpose of illustration and description only and is not intended as a definition of the limits of the present invention.

#### BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0025] For a more complete understanding of the present invention, reference is now made to the following descriptions taken in conjunction with the accompanying drawings.

WO 02/088314

PCT/US02/13245

**[0026]** FIGURE 1. Multi-tissue Northern blot analysis of ovary-specific genes. Northern blot analysis was performed on total RNA using O1-180, O1-184, and O1-236 probes. These gene products demonstrate an ovary-specific pattern (OV, ovary; WT, wild-type; *-/-*, *Gdf9* knockout) as shown. The migration positions of 18S and 28S ribosomal RNA are indicated. All lanes had approximately equal loading as demonstrated using an 18S rRNA cDNA probe. Br, brain; Lu, lung; He, heart; St, stomach; Sp, spleen; Li, liver; Si, small intestine; Ki, kidney; Te, testes; Ut, uterus.

**[0027]** FIGURES 2A-2F. *In situ* hybridization analysis of ovary-specific genes in mouse ovaries. *In situ* hybridization was performed using anti-sense probes to O1-180 (Figures 2A-2B), O1-184 (Figures 2C-2D) and O1-236 (Figures 2E-2F). Figures 2A, 2C, and 2E are brightfield analysis of the ovaries. Figures 2B, 2D, and 2F are darkfield analysis of the same ovary sections. All genes demonstrate specific expression in the oocyte beginning at the one layer primary follicle stage (small arrows) and continuing through the antral follicle stage (large arrows).

**[0028]** FIGURES 3A and 3B. *In situ* hybridization analysis of O1-236 in mouse ovaries. *In situ* hybridization was performed using probe O1-236 (partial *Npm2* cDNA fragment). Brightfield analysis (Figure 3A) and darkfield analysis (Figure 3B) of the O1-236 mRNA in the same adult ovary sections. The probe demonstrates specific expression in all growing oocytes. Oocyte-specific expression is first seen in the early one layer primary follicle (type 3a), with higher expression in the one layer type 3b follicle and all subsequent stages including antral (an) follicles.

**[0029]** FIGURE 4. *Npm2* cDNA representation. Schematic representation of the mouse *Npm2* cDNA sequence (984 bp) and two of the clones isolated from the mouse ovary cDNA libraries. The original O1-236 probe (749 bp) is shown at the top and encompasses the entire *Npm2* open reading frame. The open reading frame (solid box) is 621 bp and the 5' UTR and 3' UTR sequences (thin lines) are 155 bp and 205 bp, respectively. The polyA sequences are not depicted. Clone 236-1 (*Npm2*) was isolated from the wild-type ovary cDNA library and clone 236-3 was isolated from the *Gdf9* knockout ovary cDNA library. Clone 236-3 (984 bp excluding polyA sequence) is 4 bp longer at the 5' end and 1 bp longer at the 3' end than clone 236-1 (979 bp excluding polyA sequences).

WO 02/088314

PCT/US02/13245

[0030] FIGURE 5. Amino acid sequence conservation among *Xenopus laevis* (SEQ.ID.NO.15), mouse (SEQ.ID. NO.6), and human (SEQ.ID.NO.9) NPM2 proteins. Using the NCBI blast search tools and Megalign software, comparison of mouse (m), human (h), and *Xenopus laevis* NPM2 amino acid sequences reveals high identity (amino acids highlighted in blue). Spaces between the amino acids indicate gaps to aid in the alignment. Also identified are the conserved bipartite nuclear localization signal (red), the highly acidic histone and protamine binding region (red), and several conserved casein kinase II (CK2) and protein kinase C (PKC) phosphorylation sites (underlined and marked with "CK" or "PKC"). Other predicted phosphorylation sites in the nucleoplasmins, which are not conserved, are not shown.

[0031] FIGURE 6A and FIGURE 6B. Structure of the mouse *Npm2* gene (Figure 6A). Two overlapping recombinant lambda clones (236-13 and 236-14), isolated from a mouse 129/SvEv library, are shown at the top, and a schematic enlargement of the *Npm2* gene is also depicted. Open boxes represent untranslated regions and solid black boxes represent protein coding regions. The 236-13 insert is ~19.0 kb and 236-14 insert is ~21.0 kb. The entire contig is ~37 kb. All 9 exons of the *Npm2* gene are encompassed on a single 6.9 kb XbaI (X) fragment as shown. The size of exons and introns are shown at the bottom. Abbreviations: B, BamHI; (B), predicted but unmapped BamHI; (N), NotI from phage cloning site. Figure 6B shows the structure of the human *Npm2* gene.

[0032] FIGURES 7A and 7B. Mouse *Npm2* gene (SEQ ID NO: 7) and amino acid sequences (SEQ.ID.NO.6). Uppercase letters represent sequence identity with the *Npm2* cDNA sequences; non-transcribed 5' and 3' sequences and intron sequences are shown in lowercase. The predicted transcription initiation codon, the termination codon, and the polyadenylation signal sequence are all underlined. Numbers along the left side represent the amino acids. The underlined and bolded "T" in codon 36, the bolded "c" for amino acid 26, and the underlined and bolded "C" in the 3' UTR sequence indicate differences between the cDNA and gene sequences. Arrows indicate where the O1-236 fragment initiates and ends in the cDNA sequence.

[0033] FIGURE 8. Chromosomal localization of the mouse *Npm2* gene. (Top) Map figure from the T31 radiation hybrid database at The Jackson Laboratory showing Chromosome 14 data. The map is depicted with the centromere toward the top. Distances between adjacent loci in centiRay3000 are shown to the left of the chromosome bar. The positions of some of the chromosome 14 MIT markers are shown on the right. The mouse *Npm2*

WO 02/088314

PCT/US02/13245

gene is positioned between D14Mit203 and D14Mit32. Missing typings were inferred from surrounding data where assignment was unambiguous. (Bottom) Haplotype figure from the T31 radiation hybrid database at The Jackson Laboratory showing part of Chromosome 14 with loci linked to *Npm2*. Loci are listed in the best fit order with the most proximal at the top. The black boxes represent hybrid cell lines scoring positive for the mouse fragment and the white boxes represent cell lines scoring as negative. The grey box indicates an untyped or ambiguous line. The number of lines with each haplotype is given at the bottom of each column of boxes. Missing typings were inferred from surrounding data where assignment was unambiguous.

**[0034]** FIGURES 9A-9H. Analysis of *Npm2* mRNA and NPM2 protein in mouse ovaries and early embryos. *In situ* hybridization was performed using probe O1-236 (partial *Npm2* cDNA fragment). Brightfield analysis (Figure 9A) and darkfield analysis (Figure 9B) of the O1-236 mRNA in the same adult ovary sections. (Figure 9C) Immunohistochemistry of ovaries from a 5-week old mouse stained for NPM2 in the nuclei (bright red) of oocytes from type 3 (arrow) to antral follicles. (Figure 9D) In preovulatory GVB oocytes induced by luteinizing hormone (hCG), NPM2 is evenly stained in the cytoplasm (arrow). An LH (hCG) unresponsive preantral follicle (upper right) continues to demonstrate an oocyte with NPM2 protein localized to the nucleus. (Figure 9E) After fertilization, NPM2 begins to localize in the pronuclei; the formation of one pronucleus (arrow), is in the process of forming and some of NPM2 staining continues to be present in the cytoplasm of this early one cell embryo. (Figure 9F) The pronuclei stain strongly in an advanced one cell embryo where very little NPM2 remains in the cytoplasm. NPM2 antibodies also specifically stain the nuclei of two cell (Figure 9G) and eight cell (FIGURE 9H) embryos.

**[0035]** FIGURES 10A-10C. Gene targeting construct for a knockout of *Npm2* and genotype analysis of offspring from heterozygote intercrosses. (Figure 10A) The targeting strategy used to delete exon 2, exon 3, and the junction region of exon 4. PGK-hprt and MC1-tk expression cassettes are shown. Recombination were detected by Southern blot analysis using 5' and 3' probes. (B, BamHI; Bg, Bgl II; P, Pst I). (Figure 10B) Southern blot analysis of genomic DNA isolated from mice generated from intercrosses of *Npm2*<sup>+/−</sup> mice. The 3' probe identifies the wild-type 7.5-kb band and the mutant 10.3-kb band when DNA was digested with Bgl II. (Figure 10C) When DNA was digested with Pst I, the exon 2 probe against only detected the wild-type 4.5-kb fragment.

WO 02/088314

PCT/US02/13245

[0036] FIGURES 11A-11F. Histological analysis of ovaries from wild-type, *Npm2*<sup>+/+</sup>, and *Npm2*<sup>-/-</sup> mice. (Figure 11A-11D) Immunohistochemistry of ovaries from 6-week old mice stained for *Npm2* in the nuclei of oocytes (Figure 11A and Figure 11C for *Npm2*<sup>+/+</sup> ovaries; FIGURE 11B and FIGURE 11D for *Npm2*<sup>-/-</sup> ovaries). (Figure 11E-11F) PAS (Periodic acid Schiff)/hematoxylin staining of ovaries from 12 week old mice wild-type (Figure 11E) and *Npm2*<sup>-/-</sup> (Figure 11F) ovaries. Arrows show large antral follicles; "CL" denote corpora lutea.

[0037] FIGURES 12A-12D. *In vitro* culture of eggs and fluorescent-labeling of DNA from fertilized eggs from *Npm2*<sup>-/-</sup> and control mice. Eggs were isolated from the oviducts of immature mice after superovulation and cultured *in vitro*. Pictures were taken under a microscope at 24 and 48 hours of culture. (Figures 12A, 12C) Most of the eggs from wild-type mice divided to form two cell embryos by 24 h; some of two cell embryos progressed to the four cell stage after 48 h of culture. (Figures 12B, 12D) Very few eggs from *Npm2*<sup>-/-</sup> mice cleaved into two cell embryos; no four cell embryos were detected after 48 hours of culture. Some developmentally abnormal or apparently apoptosed embryos from *Npm2*<sup>-/-</sup> mice were detected.

[0038] FIGURES 13A-13F. Localization of O1-180 in mouse ovaries. Expression of O1-180 in PMSG-treated wild-type (Figures 13A and 13B) and *Gdf9* knockout (Figures 13C-13F) ovaries was analyzed by *in situ* hybridization with a specific antisense probe. The expression of O1-180 gene was detectable at early primary follicle stage (type 3a) through ovulatory follicle stage, but not in primordial follicles in wild-type ovaries. In *Gdf9* knockout ovaries, the follicle numbers was increased per unit volume due to the arrest of follicle development at primary follicle stage, more O1-180 positive signal were detected in each section. Figures 13A, 13C and 13E, brightfield analysis of the ovaries; Figures 13B, 13D and 13F, corresponding darkfield analysis of the same ovary sections. Figures 13E and 13F were high power magnification of the same sections shown in Figures 13C and 13D.

[0039] FIGURE 14. Structure of the O1-180 (SEQ.ID.NO.11) gene and O1-180 (SEQ.ID.NO.12) pseudogene. Diagrams representing the O1-180 pseudogene and the O1-180 gene are shown at the top along with unique restriction endonucleases sites which were important in constructing the linear map shown at the bottom. Exons and introns are drawn to scale. Boxes denote exons, hatched regions denote protein coding portions and the solid regions denote the untranslated portions. Lines connecting boxes denote introns. O1-180ps: O1-180 pseudogene; O1-180: O1-180 gene; B: BamHI; S: Sall; X: XhoI;

WO 02/088314

PCT/US02/13245

[0040] FIGURES 15A and 15B. Comparison of O1-180 gene and O1-180 pseudogene. Sequences of exons, exon-intron boundaries and the size of each intron are shown. Different nucleotides between the two genes and consensus polyadenylation sequence are underlined. The translation start codon and stop codon are shown in bold. Upper case: exon sequences; lower case: intron sequences.

[0041] FIGURE 16. Maps of mouse chromosome 5, showing the position in centiMorgan (cM) of the marker best linked to O1-180 gene (A) and its related pseudogene (B) (data and maps generated at the Jackson Laboratory Bioinformatics Server).

[0042] FIGURE 17. Gene targeting constructs for O1-180. The targeting strategy used to delete exon 1. PGK-hprt and MC1- $\beta$  expression cassettes are shown.

[0043] FIGURE 18. Northern blot analysis of O1-180 mRNA expression in multiple tissues.

[0044] FIGURE 19. Western blot analysis of recombinant O1-180.

[0045] FIGURES 20A-20F. Immunostaining of O1-180 in mouse ovaries. Anti-O1-180 polyclonal antibodies (made in goats) were used for IHC to detect the expression of O1-180 in mouse ovary sections. Figures 20A-Figure 20D are wild-type ovaries; Figure 20E-Figure 20F are *Gdf9* knockout ovaries. Figure 20b is a negative control with normal goat serum. The O1-180 protein was localized specifically to the cytoplasm of mouse oocytes and zygotes but disappears after this point. Staining indicates the location of the O1-180 protein.

[0046] FIGURES 21A AND 21B. In vitro culture of O1-190 mouse embryos. FIGURE 21A shows embryos cultured from O1-180<sup>+/+</sup> mice and Figure 21B shows embryos cultured from O1-180<sup>-/-</sup> mice. On the third day of in vitro culture in M16 medium, most control embryos progressed to the morula or blastocyst stage, while zygotes in O1-180 knockout mice still remained at the one-cell or two-cell stage.

[0047] FIGURE 22. This figure shows a comparison of the human and mouse O1-180 proteins. The differences are underlined. The proteins have a similarity of 91.3%.



WO 02/088314

PCT/US02/13245

**DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION**

**[0048]** It is readily apparent to one skilled in the art that various embodiments and modifications can be made to the invention disclosed in this Application without departing from the scope and spirit of the invention.

**[0049]** As used herein, the use of the word “a” or “an” when used in conjunction with the term “comprising” in the sentences and/or the specification may mean “one,” but it is also consistent with the meaning of “one or more,” “at least one,” and “one or more than one.”

**[0050]** As used herein, the term “animal” refers to a mammal, such as human, non-human primates, horse, cow, elephant, cat, dog, rat or mouse. In specific embodiments, the animal is a human.

**[0051]** As used herein, the term “antibody” is intended to refer broadly to any immunologic binding agent such as IgG, IgM, IgA, IgD and IgE. Generally, IgG and/or IgM are preferred because they are the most common antibodies in the physiological situation and because they are most easily made in a laboratory setting. Thus, one of skill in the art understands that the term “antibody” refers to any antibody-like molecule that has an antigen binding region, and includes antibody fragments such as Fab', Fab, F(ab')<sub>2</sub>, single domain antibodies (DABs), Fv, scFv (single chain Fv), and the like. The techniques for preparing and using various antibody-based constructs and fragments are well known in the art. (See, *e.g.*, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988).

**[0052]** As used herein, the term “binding protein” refers to proteins that demonstrate binding affinity for a specific ligand. Binding proteins may be produced from separate and distinct genes. For a given ligand, the binding proteins that are produced from specific genes are distinct from the ligand binding domain of the receptor.sub.r or its soluble receptor

**[0053]** As used herein, the term “conception” refers to the union of the male sperm and the ovum of the female; fertilization.

**[0054]** As used herein, the term “contraception” refers to the prevention or blocking of conception. A contraceptive device, thus, refers to any process, device, or method

WO 02/088314

PCT/US02/13245

that prevents conception. Well known categories of contraceptives include, steroids, chemical barrier, physical barrier; combinations of chemical and physical barriers; use of immunocontraceptive methods by giving either antibodies to the reproductive antigen of interest or by developing a natural immune response to the administered reproductive antigen; abstinence and permanent surgical procedures. Contraceptives can be administered to either males or females.

[0055] As used herein, the term "DNA" is defined as deoxyribonucleic acid.

[0056] As used herein, the term "DNA segment" refers to a DNA molecule that has been isolated free of total genomic DNA of a particular species. Included within the term "DNA segment" are DNA segments and smaller fragments of such segments, and also recombinant vectors, including, for example, plasmids, cosmids, phage, viruses, and the like.

[0057] As used herein, the term "expression construct" or "transgene" is defined as any type of genetic construct containing a nucleic acid coding for gene products in which part or all of the nucleic acid encoding sequence is capable of being transcribed can be inserted into the vector. The transcript is translated into a protein, but it need not be. In certain embodiments, expression includes both transcription of a gene and translation of mRNA into a gene product. In other embodiments, expression only includes transcription of the nucleic acid encoding genes of interest. In the present invention, the term "therapeutic construct" may also be used to refer to the expression construct or transgene. One skilled in the art realizes that the present invention utilizes the expression construct or transgene as a therapy to treat infertility. Yet further, the present invention utilizes the expression construct or transgene as a "prophylactic construct" for contraception. Thus, the "prophylactic construct" is a contraceptive.

[0058] As used herein, the term "expression vector" refers to a vector containing a nucleic acid sequence coding for at least part of a gene product capable of being transcribed. In some cases, RNA molecules are then translated into a protein, polypeptide, or peptide. In other cases, these sequences are not translated, for example, in the production of antisense molecules or ribozymes. Expression vectors can contain a variety of control sequences, which refer to nucleic acid sequences necessary for the transcription and possibly translation of an operatively linked coding sequence in a particular host organism. In addition to control sequences that

WO 02/088314

PCT/US02/13245

govern transcription and translation, vectors and expression vectors may contain nucleic acid sequences that serve other functions as well and are described *infra*.

[0059] As used herein, the term "gene" is used for simplicity to refer to a functional protein, polypeptide or peptide encoding unit. This functional term includes both genomic sequences, cDNA sequences and engineered segments that express, or may be adapted to express, proteins, polypeptides, domains, peptides, fusion proteins and mutant. Thus, one of skill in the art is aware that the term "native gene" refers to a gene as found in nature with its own regulatory sequences and the term "chimeric gene" refers to any gene that is not a native gene, comprising regulatory and coding sequences that are not found together in nature. Accordingly, a chimeric gene may comprise regulatory sequences and coding sequences that are derived from different sources, or regulatory sequences and coding sequences that are derived from the same source, but arranged in a manner different than that found in nature.

[0060] As used herein, the term "fertility" refers to the quality of being productive or able to conceive. Fertility relates to both male and female animals.

[0061] The term "hyperproliferative disease" is defined as a disease that results from a hyperproliferation of cells. Hyperproliferative disease is further defined as cancer. The hyperproliferation of cells results in unregulated growth, lack of differentiation, local tissue invasion, and metastasis. Exemplary hyperproliferative diseases include, but are not limited to cancer or autoimmune diseases. Other hyperproliferative diseases can include vascular occlusion, restenosis, atherosclerosis, or inflammatory bowel disease.

[0062] As used herein, the term "infertility" refers to the inability or diminished ability to conceive or produce offspring. Infertility can be present in either male or female. In the present invention, administration of a composition to enhance infertility or decrease fertility is reversible.

[0063] As used herein, the terms "O1-180" and "Oo1" are interchangeable.

[0064] As used herein, the terms "O1-236", Npm2" or "NPM2" are interchangeable.

WO 02/088314

PCT/US02/13245

[0065] As used herein, the term "peptide binding pair" refers to any pair of peptides having a known binding affinity for which the DNA sequence is known or can be deduced. The peptides of the peptide binding pair must exhibit preferential binding for each other over any other components of the modified cell.

[0066] As used herein, "pharmaceutically acceptable carrier" includes any and all solvents, dispersion media, coatings, antibacterial and antifungal agents, isotonic and absorption delaying agents and the like. The use of such media and agents for pharmaceutically active substances is well known in the art. Except insofar as any conventional media or agent is incompatible with the vectors or cells of the present invention, its use in therapeutic and/or prophylactic compositions is contemplated. Supplementary active ingredients also can be incorporated into the compositions.

[0067] As used herein, the term "polynucleotide" is defined as a chain of nucleotides. Furthermore, nucleic acids are polymers of nucleotides. Thus, nucleic acids and polynucleotides as used herein are interchangeable. One skilled in the art has the general knowledge that nucleic acids are polynucleotides, which can be hydrolyzed into the monomeric "nucleotides." The monomeric nucleotides can be hydrolyzed into nucleosides. As used herein polynucleotides include, but are not limited to, all nucleic acid sequences which are obtained by any means available in the art, including, without limitation, recombinant means, *i.e.*, the cloning of nucleic acid sequences from a recombinant library or a cell genome, using ordinary cloning technology and PCR™, and the like, and by synthetic means. Furthermore, one skilled in the art is cognizant that polynucleotides include mutations of the polynucleotides, include but are not limited to, mutation of the nucleotides, or nucleosides by methods well known in the art.

[0068] As used herein, the term "polypeptide" is defined as a chain of amino acid residues, usually having a defined sequence. As used herein the term polypeptide is interchangeable with the terms "peptides" and "proteins".

[0069] As used herein, the term "promoter" is defined as a DNA sequence recognized by the synthetic machinery of the cell, or introduced synthetic machinery, required to initiate the specific transcription of a gene.

WO 02/088314

PCT/US02/13245

[0070] As used herein, the term "purified protein or peptide", is intended to refer to a composition, isolatable from other components, wherein the protein or peptide is purified to any degree relative to its naturally-obtainable state. A purified protein or peptide therefore also refers to a protein or peptide, free from the environment in which it may naturally occur.

[0071] As used herein, the term "RNA" is defined as ribonucleic acid.

[0072] As used herein, the term "RNA interference" or "iRNA" is an RNA molecule that is used to inhibit a particular gene of interest.

[0073] As used herein, the term "under transcriptional control" or "operatively linked" is defined as the promoter is in the correct location and orientation in relation to the nucleic acid to control RNA polymerase initiation and expression of the gene.

[0074] In an effort to identify other novel ovarian-expressed genes that may play key functions in ovarian physiology, fertilization and early cleavage events, the inventors have used a subtractive hybridization approach. Several novel oocyte-expressed genes have been identified by the inventors which are important in regulating oogenesis, folliculogenesis, fertilization, and/or early embryogenesis. One of these oocyte-specific gene products, nucleoplasmin 2 (O1-236 or NPM2), is the mammalian ortholog of *Xenopus laevis* nucleoplasmin (xNPM2)(Burglin *et al.*, 1987; Dingwall *et al.*, 1987). The 207 amino acid open reading frame of NPM2 demonstrated high homology to the family of proteins called nucleoplasmins or nucleophosmins (nomenclature designation = species). *NPM2* human gene, *Npm2* mouse gene, and *Xnpm2* *Xenopus* gene; NPM2 = protein in all species). Human nucleophosmingene gene (*NPM1* also called NO38; accession # M23613) maps to human chromosome 5q35, encodes a 294 amino acid protein, and has orthologs in mouse (*Npm1*, also called B23, accession # Q61937) and *Xenopus laevis* (*Xnpm1* or NO38 accession # X05496). Mouse nucleoplasmin/nucleophosmin homolog *Npm3*, which has been mapped to mouse chromosome 19, encodes a protein of 175 amino acids [accession # U64450, (MacArthur and Shackleford, 1997a)], and there is an apparent human *NPM3* homolog gene (accession # AF081280). In contrast to *Npm2*, the genes *Npm1* and *Npm3* are ubiquitously expressed, and the structure of the mouse *Npm2* gene is considerably divergent compared to the mouse *Npm3* gene (MacArthur and Shackleford, 1997a).

WO 02/088314

PCT/US02/13245

[0075] The Npm2 cDNA sequences have been used by the inventors to obtain the mouse Npm2 gene and the human NPM2 cDNA and gene and also map these genes. Mice lacking Npm2 have defects in fertility due to abnormalities in early post-fertilization cleavage events. The discovery of the mammalian homolog of the most abundant nuclear protein in *Xenopus laevis* oocytes and eggs (Krohne and Franke, 1980a; Mills *et al.*, 1980) is important for a clear understanding of oogenesis, fertilization, and post-fertilization development in mammals and possibly also to define further oocyte factors which are necessary in mammalian cloning experiments.

[0076] Likewise, several studies have shown that phosphorylation of nucleoplasmin influences its function. Comparison of the forms of nucleoplasmin from the oocyte (*i.e.*, in the ovary) versus egg (*i.e.*, after ovulation and ready for fertilization) demonstrate dramatic differences in the level of phosphorylation. *Xenopus laevis* egg nucleoplasmin is substantially larger than the oocyte form, migrating ~15,000 daltons larger on SDS-PAGE due to phosphorylation differences (Sealy *et al.*, 1986). Nucleoplasmin has ~20 phosphate groups/protein in the egg compared to <10 phosphate groups/proteins in the oocyte, and an egg kinase preparation can modify the oocyte nucleoplasmin so it resembles the egg form (Cotten *et al.*, 1986). Functionally, this hyperphosphorylation of nucleoplasmin stimulates its nuclear transport (Vancurova *et al.*, 1995) and also results in a more active form, leading to increased nucleosome assembly (Sealy *et al.*, 1986) and sperm decondensation (Leno *et al.*, 1996). A hyperphosphorylated form of nucleoplasmin is also present during the early stages of *Xenopus laevis* embryogenesis where it is believed to play some function during the rapid cell cycles and DNA replication (Burghin *et al.*, 1987). The high percentage of serine and threonine residues in frog and mammalian NPM2 suggest a similar role of phosphorylation of mammalian nucleoplasmin 2 in mammalian eggs. Phosphorylation could act to regulate when NPM2 acts, making it inactive until the critical time (*i.e.*, histone addition to male and female pronuclei or during transcriptional arrest). Although there are multiple putative kinase sites in both frog and mammalian NPM2, casein kinase II specifically interacts with nucleoplasmin and phosphorylates it, and an inhibitor of casein kinase II can block nuclear transport of *Xenopus laevis* nucleoplasmin (Vancurova *et al.*, 1995). Interestingly, two of the predicted casein kinase II phosphorylation sites are conserved between frog nucleoplasmin2 (Ser125 and Ser177), mouse NPM2 (Thr123 and Ser184), and human NPM2 (Thr127 and Ser191). Although other

WO 02/088314

PCT/US02/13245

phosphorylation sites are likely important, a casein kinase II-NPM2 interaction *in vivo* could be predicted in mammals.

[0077] The present invention provides three novel proteins, O1-180 (SEQ.ID.NO.2, SEQ.ID.NO.16), O1-184 (SEQ.ID.NO.4), O1-236 (SEQ.ID.NO.6, SEQ.ID.NO.9), the polynucleotide sequences that encode them, and fragments and derivatives thereof. Expression of O1-180, O1-184, O1-236 is highly tissue-specific, being expressed in cells primarily in ovarian tissue. In one embodiment, the invention provides a method for detection of a cell proliferative or degenerative disorder of the ovary, which is associated with expression of O1-180, O1-184 or O1-236. In another embodiment, the invention provides a method for treating a cell proliferative or degenerative disorder associated with abnormal expression of O1- O1-180, O1-184, O1-236 by using an agent which suppresses or enhances their respective activities.

[0078] Based on the known activities of many other ovary specific proteins, it can be expected that O1-180, O1-184 and O1-236, as well as fragments and derivatives thereof, will also possess biological activities that will make them useful as diagnostic and therapeutic reagents.

[0079] For example, GDF-9 is an oocyte-expressed gene product which has a similar pattern of expression as O1-180, O1-184, and O1-236. It has been shown that mice lacking GDF-9 are infertile at a very early stage of follicular development, at the one-layer primary follicle stage (Dong, *et al.*). These studies demonstrate that agents which block GDF-9 function would be useful as contraceptive agents in human females. Since O1-180, O1-184, and O1-236 have an expression pattern in the oocyte (Figure 2) which is nearly identical to GDF-9, this suggests that mice and humans or any other mammal lacking any of all of these gene products would also be infertile. Thus, blocking the function of any or all of these gene products would result in a contraceptive action.

[0080] Another regulatory protein that has been found to have ovary-specific expression is inhibin, a specific and potent polypeptide inhibitor of the pituitary secretion of FSH. Inhibin has been isolated from ovarian follicular fluid. Because of its suppression of FSH, inhibin has been advanced as a potential contraceptive in both males and females. O1-180, O1-184 and O1-236 may possess similar biological activity since they are also ovarian specific peptides. Inhibin has also been shown to be useful as a marker for certain ovarian tumors

WO 02/088314

PCT/US02/13245

(Lappohn *et al.*, 1989). O1-180, O1-184, O1-236 may also be useful as markers for identifying primary and metastatic neoplasms of ovarian origin. Likewise, mice which lack inhibin develop granulosa cell tumors (Matzuk *et al.*, 1992). Similarly, O1-180, O1-184 and O1-236 may be useful as indicators of developmental or reproductive anomalies in prenatal screening procedures.

[0081] Mullerian inhibiting substance (MIS or anti-Mullerian hormone) peptide, which is produced by the testis and is responsible for the regression of the Mullerian ducts in the male embryo, has been shown to inhibit the growth of human ovarian cancer in nude mice (Donahoe *et al.*, 1981). O1-180, O1-184 and O1-236 may function similarly and may, therefore, be targets for anti-cancer agents, such as for the treatment of ovarian cancer.

[0082] O1-180, O1-184 and O1-236 proteins, agonists and antagonists thereof can be used to identify agents which inhibit fertility (*e.g.*, act as a contraceptive) in a mammal (*e.g.*, human). Additionally, O1-180, O1-184 and O1-236 and agonists and antagonists thereof can be used to identify agents which enhance fertility (*e.g.*, increase the success of *in vivo* or *in vitro* fertilization) in a mammal. Likewise, assays of these or related oocyte-expressed gene products can be used in diagnostic assays for detecting forms of infertility (*e.g.*, in an assay to analyze activity of these gene products) or other diseases (*e.g.*, germ cell tumors, polycystic ovary syndrome). Yet further, these proteins or agents which act on these pathways may also function as growth stimulatory factors and, therefore, be useful for the survival of various cell populations *in vitro*. In particular, if O1-180, O1-184 and/or O1-236 play a role in oocyte maturation, they may be useful targets for *in vitro* fertilization procedures, *e.g.*, in enhancing the success rate.

#### A. Proteins

[0083] The present invention relates to O1-180 (SEQ.ID.NO.2, SEQ.ID.NO.16), O1-184 (SEQ.ID.NO.4) and O1-236 (SEQ.ID. NO 6, SEQ.ID.NO.9) polypeptides, proteins, or agents thereof.

[0084] In addition to the entire O1-180, O1-184 or O1-236 molecules, the present invention also relates to fragments of the polypeptides that may or may not retain the functions described below. Fragments, including the N-terminus of the molecule, may be generated by genetic engineering of translation stop sites within the coding region. Alternatively, treatment of the O1-180, O1-184 or O1-236 with proteolytic enzymes, known as proteases, can produce a



WO 02/088314

PCT/US02/13245

variety of N-terminal, C-terminal and internal fragments. Fragments of proteins are seen to include any peptide that contains 6 contiguous amino acids or more that are identical to 6 contiguous amino acids of sequences of SEQ.ID.NO. 2, SEQ.ID.NO. 4, SEQ.ID.NO. 6, SEQ.ID.NO. 9 and SEQ.ID.NO.16. Fragments that contain 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200 or more contiguous amino acids or more that are identical to a corresponding number of amino acids of any of the sequences of SEQ.ID.NO. 2, SEQ.ID.NO. 4, SEQ.ID.NO. 6, SEQ.ID.NO. 9 and SEQ.ID.NO.16 are also contemplated. Fragments may be used to generate antibodies. Particularly useful fragments will be those that make up domains of O1-180, O1-184 or O1-236. Domains are defined as portions of the proteins having a discrete tertiary structure and that is maintained in the absence of the remainder of the protein. Such structures can be found by techniques known to those skilled in the art. The protein is partially digested with a protease such as subtilisin, trypsin, chymotrypsin or the like and then subjected to polyacrylamide gel electrophoresis to separate the protein fragments. The fragments can then be transferred to a PVDF membrane and subjected to micro sequencing to determine the amino acid sequence of the N-terminal of the fragments.

**[0085]** The term substantially pure as used herein refers to O1-180, O1-184 and O1-236 which are substantially free of other proteins, lipids, carbohydrates or other materials with which they are naturally associated. One skilled in the art can purify O1-180, O1-184 and O1-236 using standard techniques for protein purification. The substantially pure polypeptide will yield a single major band on a non-reducing polyacrylamide gel. The purity of the O1-180, O1-184 and O1-236 polypeptides can also be determined by amino-terminal amino acid sequence analysis. O1-180, O1-184 and O1-236 polypeptides include functional fragments of the polypeptides, as long as their activities remain. Smaller peptides containing the biological activities of O1-180, O1-184 and O1-236.

**[0086]** The polypeptides of the invention include the disclosed sequences and conservative variations thereof. The term conservative variation as used herein denotes the replacement of an amino acid residue by another, biologically similar residue. Examples of conservative variations include the substitution of one hydrophobic residue such as isoleucine, valine, leucine or methionine for another, or the substitution of one polar residue for another, such as the substitution of arginine for lysine, glutamic acid for aspartic acid, or glutamine for

WO 02/088314

PCT/US02/13245

asparagine, and the like. The term "conservative variation" also includes the use of a substituted amino acid in place of an unsubstituted parent amino acid provided that antibodies raised to the substituted polypeptide also immunoreact with the unsubstituted polypeptide.

[0087] Minor modifications of the recombinant O1-180, O1-184 and O1-236 primary amino acid sequences may result in proteins which have substantially equivalent activity as compared to the respective O1-180, O1-184 and O1-236 polypeptides described herein. Such modifications may be deliberate, as by site-directed mutagenesis, or may be spontaneous. All of the polypeptides produced by these modifications are included herein as long as the biological activity of O1-180, O1-184 or O1-236 still exists. Further, deletion of one or more amino acids can also result in a modification of the structure of the resultant molecule without significantly altering its biological activity. This can lead to the development of a smaller active molecule which would have broader utility. For example, one could remove amino or carboxy terminal amino acids which may not be required for biological activity of O1-180, O1-184 or O1-236.

[0088] For the purpose of this invention, the term derivative shall mean any molecules which are within the skill of the ordinary practitioner to make and use, which are made by modifying the subject compound, and which do not destroy the activity of the derivatized compound. Compounds which meet the foregoing criteria which diminish, but do not destroy, the activity of the derivatized compound are considered to be within the scope of the term derivative. Thus, according to the invention, a derivative of a compound comprising amino acids in a sequence corresponding to the sequence of O1-180, O1-184 or O1-236, need not comprise a sequence of amino acids that corresponds exactly to the sequence of O1-180, O1-184 or O1-236, so long as it retains a measurable amount of the activity of the O1-180, O1-184 or O1-236.

[0089] Equally, the same considerations may be employed to create a protein, polypeptide or peptide with countervailing, *e.g.*, antagonistic properties. This is relevant to the present invention in which O1-180, O1-184 or O1-236 mutants or analogues may be generated. For example, a O1-180, O1-184 or O1-236 mutant may be generated and tested for O1-180, O1-184 or O1-236 activity to identify those residues important for O1-180, O1-184 or O1-236 activity. O1-180, O1-184 or O1-236 mutants may also be synthesized to reflect a O1-180, O1-184 or O1-236 mutant that occurs in the human population and that is linked to the development of cancer. Also, O1-180, O1-184 or O1-236 mutants may be used as antagonists to inhibit or

WO 02/088314

PCT/US02/13245

enhance fertility. Thus, O1-180, O1-184 or O1-236 mutants may be used as potential contraceptive compositions and/or fertility enhancement compositions.

#### B. Nucleic Acids

[0090] The invention also provides polynucleotides encoding the O1-180 (SEQ.ID.NO.1, SEQ.ID.NO.11, SEQ.ID.NO.13 and SEQ.ID.NO.12), O1-184 (SEQ.ID.NO.3) or O1-236 (SEQ.ID.NO.5, SEQ.ID.NO.7, SEQ.ID.NO.8; SEQ.ID.NO.10, and SEQ.ID.NO.14) proteins and fragments and derivatives thereof. These polynucleotides include DNA, cDNA and RNA sequences which encode O1-180, O1-184 or O1-236. It is understood that all polynucleotides encoding all or a portion of O1-180, O1-184 and/or O1-236 are also included herein, as long as they encode a polypeptide with the activity of O1-180 (SEQ.ID.NO.1, SEQ.ID.NO.11, SEQ.ID.NO.13 and SEQ.ID.NO.12), O1-184 (SEQ.ID.NO.3) or O1-236 (SEQ.ID.NO.5, SEQ.ID.NO.7, SEQ.ID.NO.8; SEQ.ID.NO.10, and SEQ.ID.NO.14). Such polynucleotides include naturally occurring, synthetic, and intentionally manipulated polynucleotides. For example, polynucleotides of O1-180 (SEQ.ID.NO.1, SEQ.ID.NO.11, SEQ.ID.NO.13 and SEQ.ID.NO.12), O1-184 (SEQ.ID.NO.3) or O1-236 (SEQ.ID.NO.5, SEQ.ID.NO.7, SEQ.ID.NO.8; SEQ.ID.NO.10, and SEQ.ID.NO.14) may be subjected to site-directed mutagenesis. The polynucleotide sequences for O1-180, O1-184 and O1-236 also includes antisense sequences. The polynucleotides of the invention include sequences that are degenerate as a result of the genetic code. There are 20 natural amino acids, most of which are specified by more than one codon. Therefore, all degenerate nucleotide sequences are included in the invention as long as the amino acid sequences of O1-180, O1-184 and O1-236 polypeptides encoded by the nucleotide sequences are functionally unchanged.

[0091] DNA sequences of the invention can be obtained by several methods. For example, the DNA can be isolated using hybridization or amplification techniques which are well known in the art. These include, but are not limited to: 1) hybridization of genomic or cDNA libraries with probes to detect homologous nucleotide sequences, 2) antibody screening of expression libraries to detect cloned DNA fragments with shared structural features, or 3) use of oligonucleotides related to these sequences and the technique of the polymerase chain reaction.

[0092] Preferably the O1-180, O1-184 and O1-236 polynucleotides of the invention are derived from a mammalian organism, and most preferably from a mouse, rat, elephant, pig, cow or human. Screening procedures which rely on nucleic acid hybridization

WO 02/088314

PCT/US02/13245

make it possible to isolate any gene sequence from any organism, provided the appropriate probe is available. Oligonucleotide probes, which correspond to a part of the sequence encoding the protein in question, can be synthesized chemically. This requires that short, oligopeptide stretches of amino acid sequence must be known. The DNA sequence encoding the protein can be deduced from the genetic code, however, the degeneracy of the code must be taken into account. It is possible to perform a mixed addition reaction when the sequence is degenerate. This includes a heterogeneous mixture of denatured double-stranded DNA. For such screening, hybridization is preferably performed on either single-stranded DNA or denatured double-stranded DNA. Hybridization is particularly useful in the detection of cDNA clones derived from sources where an extremely low amount of mRNA sequences relating to the polypeptide of interest are present. In other words, by using stringent hybridization conditions directed to avoid non-specific binding, it is possible, for example, to allow the autoradiographic visualization of a specific cDNA done by the hybridization of the target DNA to that single probe in the mixture which is its complete complement (Wallace *et al.*, 1981).

[0093] The development of specific DNA sequences encoding O1-180, O1-184 and O1-236 can also be obtained by: 1) isolation of double-stranded DNA sequences from the genomic DNA; 2) chemical manufacture of a DNA sequence to provide the necessary codons for the polypeptides of interest; and 3) *in vitro* synthesis of a double-stranded DNA sequence by reverse transcription of mRNA isolated from a eukaryotic donor cell. In the latter case, a double-stranded DNA complement of mRNA is eventually formed which is generally referred to as cDNA.

[0094] Of the three above-noted methods for developing specific DNA sequences for use in recombinant procedures, the isolation of genomic DNA isolates is the least common. This is especially true when it is desirable to obtain the microbial expression of mammalian polypeptides due to the presence of introns.

[0095] The synthesis of DNA sequences is frequently the method of choice when the entire sequence of amino acid residues of the desired polypeptide product is known. When the entire sequence of amino acid residues of the desired polypeptides is not known, the direct synthesis of DNA sequences is not possible and the method of choice is the synthesis of cDNA sequences. Among the standard procedures for isolating cDNA sequences of interest is the formation of plasmid- or phage-carrying cDNA libraries, which are derived from reverse

WO 02/088314

PCT/US02/13245

transcription of mRNA which is abundant in donor cells that have a high level of genetic expression. When used in combination with polymerase chain reaction technology, even rare expression products can be cloned. In those cases where significant portions of the amino acid sequence of the polypeptide are known, the production of labeled single or double-stranded DNA or RNA probe sequences duplicating a sequence putatively present in the target cDNA may be employed in DNA/DNA hybridization procedures which are carried out on cloned copies of the cDNA which have been denatured into a single-stranded form (Jay *et al.*, 1983).

[0096] A cDNA expression library, such as lambda gt11, can be screened indirectly for O1-180, O1-184 and/or O1-236 peptides having at least one epitope, using antibodies specific for O1-180, O1-184 and/or O1-236. Such antibodies can be either polyclonally or monoclonally derived and used to detect expression product indicative of the presence of O1-180, O1-184 and/or O1-236 cDNA.

[0097] DNA sequences encoding O1-180, O1-184 or O1-236 can be expressed *in vitro* by DNA transfer into a suitable host cell. Host cells are cells in which a vector can be propagated and its DNA expressed. The term also includes any progeny of the subject host cell. It is understood that all progeny may not be identical to the parental cell since there may be mutations that occur during replication. However, such progeny are included when the term host cell is used. Methods of stable transfer, meaning that the foreign DNA is continuously maintained in the host, are known in the art.

[0098] In the present invention, the O1-180, O1-184 and/or O1-236 polynucleotide sequences may be inserted into a recombinant expression vector. The term recombinant expression vectors refers to a plasmid, virus or other vehicle known in the art that has been manipulated by insertion or incorporation of the O1-180, O1-184 or O1-236 genetic sequences. Such expression vectors contain a promoter sequence which facilitates the efficient transcription of the inserted genetic sequence of the host. The expression vector typically contains an origin of replication, a promoter, as well as specific genes which allow phenotypic selection of the transformed cells. Vectors suitable for use in the present invention include, but are not limited to the T7-based expression vector for expression in bacteria (Rosenberg *et al.*, 1987), the pMSXND expression vector for expression in mammalian cells (Lee and Nathans, 1988) and baculovirus-derived vectors for expression in insect cells. The DNA segment can be present in the vector operably linked to regulatory elements, for example, a promoter (*e.g.*, T7, metallothionein 1, or

WO 02/088314

PCT/US02/13245

polyhedrin promoters). Polynucleotide sequences encoding O1-180, O1-184 or O1-236 can be expressed in either prokaryotes or eukaryotes. Hosts can include microbial, yeast, insect and mammalian organisms. Methods of expressing DNA sequences having eukaryotic or viral sequences in prokaryotes are well known in the art. Biologically functional viral and plasmid DNA vectors capable of expression and replication in a host are known in the art. Such vectors are used to incorporate DNA sequences of the invention.

[0099] Transformation of a host cell with recombinant DNA may be carried out by conventional techniques as are well known to those skilled in the art. Where the host is prokaryotic, such as *E. coli*, competent cells which are capable of DNA uptake can be prepared from cells harvested after exponential growth phase and subsequently treated by the  $\text{CaCl}_2$  method using procedures well known in the art. Alternatively,  $\text{MgCl}_2$  or  $\text{RbCl}$  can be used. Transformation can also be performed after forming a protoplast of the host cell if desired.

[0100] When the host is a eukaryote, such methods of transfection of DNA as calcium phosphate co-precipitates, conventional mechanical procedures such as microinjection, electroporation, insertion of a plasmid encased in liposomes, or virus vectors may be used. Eukaryotic cells can also be co-transformed with DNA sequences encoding the O1-180, O1-184 or O1-236 cDNA sequences of the invention, and a second foreign DNA molecule encoding a selectable phenotype, such as the neomycin resistance gene. Another method is to use a eukaryotic viral vector, such as simian virus 40 (SV40) or bovine papilloma virus, to transiently infect or transform eukaryotic cells and express the protein. (see for example, Eukaryotic Viral Vectors, Cold Spring Harbor Laboratory, Gluzman ed., 1982).

[0101] Isolation and purification of microbial expressed polypeptide, or fragments thereof, provided by the invention, may be carried out by conventional means including preparative chromatography and immunological separations involving monoclonal or polyclonal antibodies.

[0102] The invention includes antibodies immunoreactive with O1-180, O1-184 or O1-236 polypeptides or functional fragments thereof. Antibodies, which consists essentially of pooled monoclonal antibodies with different epitopic specificities, as well as distinct monoclonal antibodies, are provided. Monoclonal antibodies are made from antigen containing fragments of the protein by methods well known to those skilled in the art (Kohler, *et al.*, Nature, 256:495,

WO 02/088314

PCT/US02/13245

1975). The term antibody as used in this invention is meant to include intact molecules as well as fragments thereof, such as Fab and F(ab')<sub>2</sub>, which are capable of binding an epitopic determinant on O1-180, O1-184 or O1-236.

#### C. Diagnostic Uses

[0103] The term cell-degenerative disorder denotes the loss of any type of cell in the ovary, either directly or indirectly. For example, in the absence of GDF-9, there is a block in the growth of the granulosa cells leading to eventual degeneration (*i.e.*, death) of the oocytes (Dong *et al.*, 1996). This death of the oocyte appears to lead to differentiation of the granulosa cells. In addition, in the absence of GDF-9, no normal thecal cell layer is formed around the follicles. Thus, in the absence of one oocyte-specific protein, GDF-9, there are defects in three different cell lineages, oocytes, granulosa cells, and thecal cells. In a similar way, death or differentiation of these various cell lineages could be affected by absence or misexpression of O1-180, O1-184, or O1-236.

[0087] Absence or misexpression of O1-180, O1-184, or O1-236 could result in defects in the oocyte/egg leading to the inability of the egg to be fertilized by spermatozoa. Alternatively, embryos may not develop or halt development during the early stage of embryogenesis or show defects in fertilization secondary to absence of these oocyte derived factors. Therefore, O1-180, O1-184 or O1-236 compositions may be employed as a diagnostic or prognostic indicator of infertility in general. More specifically, point mutations, deletions, insertions or regulatory perturbations can be identified. The present invention contemplates further the diagnosis of infertility detecting changes in the levels of O1-180, O1-184 or O1-236 expression.

[0104] One embodiment of the instant invention comprises a method for detecting variation in the expression of O1-180, O1-184 or O1-236. This may comprise determining the level of O1-180, O1-184 or O1-236 expressed, or determining specific alterations in the expressed product. In specific embodiments, alterations are detected in the expression of O1-180, O1-184 or O1-236.

[0105] The biological sample can be tissue or fluid. Various embodiments include cells from the testes and ovaries. Other embodiments include fluid samples such as vaginal fluid or seminal fluid.

WO 02/088314

PCT/US02/13245

[0106] Nucleic acids used are isolated from cells contained in the biological sample, according to standard methodologies (Sambrook *et al.*, 1989). The nucleic acid may be genomic DNA or fractionated or whole cell RNA. Where RNA is used, it may be desired to convert the RNA to a complementary DNA (cDNA). In one embodiment, the RNA is whole cell RNA; in another, it is poly-A RNA. Normally, the nucleic acid is amplified.

[0107] Depending on the format, the specific nucleic acid of interest is identified in the sample directly using amplification or with a second, known nucleic acid following amplification. Next, the identified product is detected. In certain applications, the detection may be performed by visual means (*e.g.*, ethidium bromide staining of a gel). Alternatively, the detection may involve indirect identification of the product via chemiluminescence, radioactive scintigraphy of radiolabel or fluorescent label or even via a system using electrical or thermal impulse signals (Affymax Technology; Bellus, 1994).

[0108] Following detection, one may compare the results seen in a given patient with a statistically significant reference group of normal patients and patients that have been diagnosed with infertility.

[0109] It is contemplated that other mutations in the O1-180, O1-184 or O1-236 polynucleotide sequences may be identified in accordance with the present invention by detecting a nucleotide change in particular nucleic acids (U.S. Patent 4,988,617, incorporated herein by reference). A variety of different assays are contemplated in this regard, including but not limited to, fluorescent *in situ* hybridization (FISH; U.S. Patent 5,633,365 and U.S. Patent 5,665,549, each incorporated herein by reference), direct DNA sequencing, PFGE analysis, Southern or Northern blotting, single-stranded conformation analysis (SSCA), RNase protection assay, allele-specific oligonucleotide (ASO, *e.g.*, U.S. Patent 5,639,611), dot blot analysis, denaturing gradient gel electrophoresis (*e.g.*, U.S. Patent 5,190,856 incorporated herein by reference), RFLP (*e.g.*, U.S. Patent 5,324,631 incorporated herein by reference) and PCR<sup>TM</sup>-SSCP. Methods for detecting and quantitating gene sequences, such as mutated genes and oncogenes, in for example biological fluids are described in U.S. Patent 5,496,699, incorporated herein by reference.

[0110] Yet further, it is contemplated by that chip-based DNA technologies such as those described by Hacia *et al.* (1996) and Shoemaker *et al.* (1996) can be used for diagnosis of



WO 02/088314

PCT/US02/13245

infertility. Briefly, these techniques involve quantitative methods for analyzing large numbers of genes rapidly and accurately. By tagging genes with oligonucleotides or using fixed probe arrays, one can employ chip technology to segregate target molecules as high density arrays and screen these molecules on the basis of hybridization. See also Pease *et al.*, (1994); Fodor *et al.*, (1991).

[0111] Antibodies can be used in characterizing the O1-180, O1-184 or O1-236 content through techniques such as ELISAs and Western blot analysis. This may provide a prenatal screen or in counseling for those individuals seeking to have children.

[0112] The steps of various other useful immunodetection methods have been described in the scientific literature, such as, *e.g.*, Nakamura *et al.*, (1987). Immunoassays, in their most simple and direct sense, are binding assays. Certain preferred immunoassays are the various types of radioimmunoassays (RIA) and immunobead capture assay. Immunohistochemical detection using tissue sections also is particularly useful. However, it will be readily appreciated that detection is not limited to such techniques, and Western blotting, dot blotting, FACS analyses, and the like also may be used in connection with the present invention.

[0113] The antibodies of the invention can be bound to many different carriers and used to detect the presence of an antigen comprising the polypeptide of the invention. Samples of well-known carriers include glass, polystyrene, polypropylene, polyethylene, dextran, nylon, amylases, natural and modified celluloses, polyacrylamides, agaroses and magnetite. The nature of the carrier can be either soluble or insoluble for purposes of the invention. Those skilled in the art will know of other suitable carriers for binding antibodies, or will be able to ascertain such, using routine experimentation.

[0114] There are many different labels and methods of labeling known to those of ordinary skill in the art. Examples of the types of labels which can be used in the present invention include enzymes, radioisotopes, fluorescent compounds, colloidal metals, chemiluminescent compounds, phosphorescent compounds, and bioluminescent compounds. Those of ordinary skill in the art will know of other suitable labels for binding to the antibody, or will be able to ascertain such, using routine experimentation.

WO 02/088314

PCT/US02/13245

[0115] Another technique which may also result in greater sensitivity consists of coupling the antibodies to low molecular weight haptens. These haptens can then be specifically detected by means of a second reaction. For example, it is common to use such haptens as biotin, which reacts with avidin, or dinitrophenyl, puridoxal, and fluorescein, which can react with specific anti-hapten antibodies.

[0116] In using the monoclonal antibodies of the invention for the *in vivo* detection of antigen, the detectably labeled antibody is given a dose which is diagnostically effective. The term diagnostically effective means that the amount of detectably labeled monoclonal antibody is administered in sufficient quantity to enable detection of the site having the antigen composing a polypeptide of the invention for which the monoclonal antibodies are specific. The concentration of detectably labeled monoclonal antibody which is administered should be sufficient such that the binding to those cells having the polypeptide is detectable compared to the background. Further, it is desirable that the detectably labeled monoclonal antibody be rapidly cleared from the circulatory system in order to give the best target-to-background signal ratio. As a rule, the dosage of detectably labeled monoclonal antibody for *in vivo* diagnosis will vary depending on such factors as age, sex, and extent of disease of the individual. Such dosages may vary, for example, depending on whether multiple injections are given, antigenic burden, and other factors known to those of skill in the art.

[0117] For *in vivo* diagnostic imaging, the type of detection instrument available is a major factor in selecting a given radioisotope. The radioisotope chosen must have a type of decay which is detectable for a given type of instrument. Still another important factor in selecting a radioisotope for *in vivo* diagnosis is that deleterious radiation with respect to the host is minimized. Ideally, a radioisotope used for *in vivo* imaging will lack a particle emission, but produce a large number of photons in the 140-250 keV range, which may readily be detected by conventional gamma cameras.

[0118] For *in vivo* diagnosis, radioisotopes may be bound to immunoglobulin either directly or indirectly by using an intermediate functional group. Intermediate functional groups which often are used to bind radioisotopes which exist as metallic ions to immunoglobulins are the bifunctional chelating agents such as diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and similar molecules. Typical examples of metallic

WO 02/088314

PCT/US02/13245

ions which can be bound to the monoclonal antibodies of the invention are  $^{111}\text{In}$ ,  $^{97}\text{Ru}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{72}\text{As}$ ,  $^{89}\text{Zr}$  and  $^{201}\text{Tl}$ .

[0119] The monoclonal antibodies of the invention can also be labeled with a paramagnetic isotope for purposes of *in vivo* diagnosis, as in magnetic resonance imaging (MRI) or electron spin resonance (ESR). In general, any conventional method for visualizing diagnostic imaging can be utilized. Usually gamma and positron emitting radioisotopes are used for camera imaging and paramagnetic isotopes for MRI. Elements which are particularly useful in such techniques include  $^{157}\text{Gd}$ ,  $^{55}\text{Mn}$ ,  $^{162}\text{Dy}$ ,  $^{55}\text{Cr}$  and  $^{56}\text{Fe}$ .

[0120] The term cell-proliferative disorder or hyperproliferative disorder denotes malignant as well as non-malignant cell populations which often appear to differ from the surrounding tissue both morphologically and genotypically. The O1-180, O1-184 and O1-236 polynucleotides that are antisense molecules are useful in treating malignancies of the various organ systems, particularly, for example, the ovaries. Essentially, any disorder which is etiologically linked to altered expression of O1-180, O1-184 or O1-236 could be considered susceptible to treatment with a O1-180, O1-184 or O1-236 suppressing reagent, respectively.

[0121] The invention provides a method for detecting a cell proliferative disorder of the ovary which comprises contacting an anti-O1-180, O1-184 or O1-236 antibody with a cell suspected of having an O1-180, O1-184 or O1-236 associated disorder and detecting binding to the antibody. The antibody reactive with O1-180, O1-184 or O1-236 is labeled with a compound which allows detection of binding to O1-180, O1-184 or O1-236, respectively. For purposes of the invention, an antibody specific for an O1-180, O1-184 or O1-236 polypeptide may be used to detect the level of O1-180, O1-184 or O1-236, respectively, in biological fluids and tissues. Any specimen containing a detectable amount of antigen can be used. A preferred sample of this invention is tissue of ovarian origin, specifically tissue containing oocytes or ovarian follicular fluid. The level of O1-180, O1-184 or O1-236 in the suspect cell can be compared with the level in a normal cell to determine whether the subject has an O1-180, O1-184 or O1-236-associated cell proliferative disorder. Preferably the subject is human. The antibodies of the invention can be used in any subject in which, it is desirable to administer *in vitro* or *in vivo* immunodiagnosis or immunotherapy. The antibodies of the invention are suited for use, for example, in immunoassays in which they can be utilized in liquid phase or bound to a solid phase carrier. In addition, the antibodies in these immunoassays can be detectably labeled in various ways. Examples of

WO 02/088314

PCT/US02/13245

types of immunoassays which can utilize antibodies of the invention are competitive and non-competitive immunoassays in either a direct or indirect format. Examples of such immunoassays are the radioimmunoassay (RIA) and the sandwich (ELISA) assay. Detection of the antigens using the antibodies of the invention can be done utilizing immunoassays which are run in either the forward, reverse, or simultaneous modes, including immunohistochemical assays on physiological samples. Those of skill in the art will know, or can readily discern, other immunoassay formats without undue experimentation.

#### D. Therapeutic Uses

[0122] Due to the expression of O1-180, O1-184 and O1-236 in the reproductive tract, there are a variety of applications using the polypeptides, polynucleotides and antibodies of the invention, related to contraception, fertility and pregnancy. O1-180, O1-184 and O1-236 could play a role in regulation of the menstrual cycle and, therefore, could be useful in various contraceptive regimens.

[0123] It is also contemplated that O1-180, O1-184, or O1-236 polynucleotide sequences, polypeptide sequences, antibodies, fragments thereof or mutants thereof may be used to inhibit or enhance early embryogenesis by disturbing the maternal genome. One of skill in the art is aware that disruptions of the maternal genome that cause phenotypes in embryonic development are termed maternal effect mutations. Two such examples have been characterized in mice using knockout technology. In each example, the gene product is normally accumulated in growing oocytes and persists in the early developing embryo and the phenotype affects offspring of knockout females, regardless of their genotype or gender. The first identified gene encodes MATER (maternal antigen that embryos require), which is necessary for development beyond the two-cell stage and has been implicated in establishing embryonic genome transcription patterns (Tong *et al.*, 2000). The second identified gene encodes DNMT1o, an oocyte-specific DNA methyltransferase critical for maintaining imprinting patterns established in the embryonic genome and the viability of the developing mouse during the last third of gestation (Howell *et al.*, 2001). Presumably many other oocyte-derived factors mediate the complexities of early embryogenesis, thus, it is contemplated that the O1-180 and O1-236 are maternal effect genes since they function in processes of early embryogenesis.

[0124] In further embodiments, it is contemplated that O1-236 or NPM2 may play a role in in chromatin remodeling during early embryonic development. For example, studies

WO 02/088314

PCT/US02/13245

have predicted the presence of a mammalian nuclear protein that is necessary for oocyte remodeling of sperm DNA, and is released into the ooplasm at germinal vesicle breakdown (Maeda *et al.*, 1998). Yet further, it is known that oocytes can efficiently remodel not only sperm nuclei during fertilization, but also somatic cell nuclei. Thus, the inventors have contemplated the role of NPM2 in nuclear transfer cloning (Zuccotti *et al.*, 2000). It envisioned that NPM2 (encoded by O1-236) is a critical factor in mammalian oocytes for chromatin remodeling during early embryonic development. Thus, supplementing enucleated oocytes with NPM2 may facilitate cloning by nuclear transfer technologies.

[0125] The monoclonal antibodies of the invention can be used *in vitro* and *in vivo* to monitor the course of amelioration of an O1-180, O1-184 or O1-236-associated disease in a subject. Thus, for example, by measuring the increase or decrease in the number of cells expressing antigen comprising a polypeptide of the invention or changes in the concentration of such antigen present in various body fluids, it would be possible to determine whether a particular therapeutic regimen aimed at ameliorating the O1-180, O1-184 or O1-236-associated disease is effective. The term ameliorate denotes a lessening of the detrimental effect of the O1-180, O1-184 or O1-236-associated disease in the subject receiving therapy.

[0126] The present invention identifies nucleotide sequences that can be expressed in an altered manner as compared to expression in a normal cell, therefore, it is possible to design appropriate therapeutic or diagnostic techniques directed to this sequence. Thus, where a cell-proliferative disorder is associated with the expression of O1-180, O1-184 or O1-236, nucleic acid sequences that interfere with the expression of O1-180, O1-184 or O1-236, respectively, at the translational level can be used. This approach utilizes, for example, antisense nucleic acids or ribozymes to block translation of a specific O1-180, O1-184 or O1-236 mRNA, either by masking that mRNA with an antisense nucleic acid or by cleaving it with a ribozyme.

[0127] Antisense nucleic acids are DNA or RNA molecules that are complementary to at least a portion of a specific mRNA molecule (Weintraub, 1990). In the cell, the antisense nucleic acids hybridize to the corresponding mRNA, forming a double-stranded molecule. The antisense nucleic acids interfere with the translation of the mRNA, since the cell will not translate a mRNA that is double-stranded. Antisense oligomers of about 15 nucleotides are preferred, since they are easily synthesized and are less likely to cause problems than larger molecules when introduced into the target O1-180, O1-184 or O1-236-producing cell. The use

WO 02/088314

PCT/US02/13245

of antisense methods to inhibit the *in vitro* translation of genes is well known in the art (Marcus-Sakura, 1988).

[0128] Ribozymes are RNA molecules possessing the ability to specifically cleave other single-stranded RNA in a manner analogous to DNA restriction endonucleases. Through the modification of nucleotide sequences which encode these RNAs, it is possible to engineer molecules that recognize specific nucleotide sequences in an RNA molecule and cleave it (Cech, 1988). A major advantage of this approach is that, because they are sequence-specific, only mRNAs with particular sequences are inactivated.

[0129] There are two basic types of ribozymes namely, tetrahymena-type (Hasselhoff, 1988) and "hammerhead"-type. Tetrahymena-type ribozymes recognize sequences which are four bases in length, while "hammerhead"-type ribozymes recognize base sequences 11-18 bases in length. The longer the recognition sequence, the greater the likelihood that the sequence will occur exclusively in the target mRNA species. Consequently, hammerhead-type ribozymes are preferable to tetrahymena-type ribozymes for inactivating a specific mRNA species and 18-based recognition sequences are preferable to shorter recognition sequences.

[0130] The present invention also provides gene therapy for the treatment of cell proliferative or degenerative disorders which are mediated by O1-180, O1-184 or O1-236 proteins. Such therapy would achieve its therapeutic effect by introduction of the respective O1-180, O1-184 or O1-236 cDNAs or O1-180, O1-184, or O1-236 antisense polynucleotide into cells having the proliferative or degenerative disorder. Delivery of O1-180, O1-184, or O1-236 cDNAs or antisense O1-180, O1-184 or O1-236 polynucleotides can be achieved using a recombinant expression vector such as a chimeric virus or a colloidal dispersion system. Especially preferred for therapeutic delivery of cDNAs or antisense sequences is the use of targeted liposomes.

[0131] Various viral vectors which can be utilized for gene therapy as taught herein include adenovirus, herpes virus, vaccinia, or, preferably, an RNA virus such as a retrovirus. Preferably, the retroviral vector is a derivative of a murine or avian retrovirus. Examples of retroviral vectors in which a single foreign gene can be inserted include, but are not limited to: Moloney murine leukemia virus (MoMuLV), Harvey murine sarcoma virus (HaMuSV), murine mammary tumor virus (MuMTV), and Rous Sarcoma Virus (RSV). A number of additional

WO 02/088314

PCT/US02/13245

retroviral vectors can incorporate multiple genes. All of these vectors can transfer or incorporate a gene for a selectable marker so that transduced cells can be identified and generated. By inserting an O1-180, O1-184 or O1-236 sequence of interest into the viral vector, along with another gene which encodes the ligand for a receptor on a specific target cell, for example, the vector is now target specific. Retroviral vectors can be made target specific by inserting, for example, a polynucleotide encoding a sugar, a glycolipid, or a protein. Preferred targeting is accomplished by using an antibody to target the retroviral vector. Those of skill in the art will know of, or can readily ascertain without undue experimentation, specific polynucleotide sequences which can be inserted into the retroviral genome to allow target specific delivery of the retroviral vector containing an O1-180, O1-184 or O1-236 cDNA or O1-180, O1-184, or O1-236 antisense polynucleotides.

[0132] Since recombinant retroviruses are defective, they require assistance in order to produce infectious vector particles. This assistance can be provided, for example, by using helper cell lines that contain plasmids encoding all of the structural genes of the retrovirus under the control of regulatory sequences within the LTR. These plasmids are missing a nucleotide sequence which enables the packing mechanism to recognize an RNA transcript for encapsidation. Helper cell lines which have deletions of the packaging signal include, but are not limited to  $\psi$ 2, PA317 and PA12, for example. These cell lines produce empty virions, since no genome is packaged. If a retroviral vector is introduced into such cells in which the packaging signal is intact, but the structural genes are replaced by other genes of interest, the vector can be packaged and vector virion produced.

[0133] Alternatively NIH 3T3 or other tissue culture cells can be directly transfected with plasmids encoding the retroviral structural genes gag, pol and env, by conventional calcium phosphate transfection. These cells are then transfected with the vector plasmid containing the genes of interest. The resulting cells release the retroviral vector into the culture medium.

[0134] Another targeted delivery system for O1-180, O1-184 or O1-236 cDNAs or O1-180, O1-184, or O1-236 antisense polynucleotides is a colloidal dispersion system. Colloidal dispersion systems include macromolecule complexes, nanocapsules complexes, nanocapsules, microspheres, beads, and lipid-based systems including oil-in-water emulsions, micelles, mixed micelles, and liposomes. The preferred colloidal system of this invention is a liposome.

WO 02/088314

PCT/US02/13245

Liposomes are artificial membrane vesicles which are useful as delivery vehicles *in vitro* and *in vivo*. It has been shown that large unilamellar vesicles (LUV), which range in size from 0.2-4.0  $\mu\text{m}$  can encapsulate a substantial percentage of an aqueous buffer containing large macromolecules. RNA, DNA and intact virions can be encapsulated within the aqueous interior and be delivered to cells in a biologically active form (Fraley *et al* 1981). In addition to mammalian cells, liposomes have been used for delivery of polynucleotides in plant, yeast and bacterial cells. In order for a liposome to be an efficient gene transfer vehicle, the following characteristics should be present: (1) encapsulation of the genes of interest at high exigency while not compromising their biological activity; (2) preferential and substantial binding to a target cell in comparison to non-target cells; (3) delivery of the aqueous contents of the vesicle to the target cell cytoplasm at high efficiency; and (4) accurate and effective expression of genetic information (Manning *et al.*, 1988).

[0135] The composition of the liposome is usually a combination of phospholipids, particularly high-phase-transition-temperature phospholipids, usually in combination with steroids, especially cholesterol. Other phospholipids or other lipids may also be used. The physical characteristics of liposomes depend on pH, ionic strength, and the presence of divalent cations.

[0136] Examples of lipids useful in liposome production include phosphatidyl compounds, such as phosphatidylglycerol, phosphatidylcholine, phosphatidylserine, phosphatidylethanolamine, sphingolipids, cerebroside, and gangliosides. Particularly useful are diacylphosphatidylglycerols, where the lipid moiety contains from 14-18 carbon atoms, particularly from 16-18 carbon atoms, and is saturated. Illustrative phospholipids include egg phosphatidylcholine, dipalmitoylphosphatidylcholine and distearoylphosphatidylcholine.

[0137] The targeting of liposomes can be classified based on anatomical and mechanistic factors. Anatomical classification is based on the level of selectivity, for example, organ-specific, cell-specific, and organelle-specific. Mechanistic targeting can be distinguished based upon whether it is passive or active. Passive targeting utilizes the natural tendency of liposomes to distribute to cells of the reticulo-endothelial system (RES) in organs which contain sinusoidal capillaries. Active targeting, on the other hand, involves alteration of the liposome by coupling the liposome to a specific ligand such as a monoclonal antibody, sugar, glycolipid, or



WO 02/088314

PCT/US02/13245

protein, or by changing the composition or size of the liposome in order to achieve targeting to organs and cell types other than the naturally occurring sites of localization.

[0138] The surface of the targeted delivery system may be modified in a variety of ways. In the case of a liposomal targeted delivery system, lipid groups can be incorporated into the lipid bilayer of the liposome in order to maintain the targeting ligand in stable association with the liposomal bilayer. Various linking groups can be used for joining the lipid chains to the targeting ligand.

#### **E. Screening for Modulators**

[0139] The present invention also contemplates the use of O1-180, O1-184 or O1-236 and active fragments, and nucleic acids coding therefore, in the screening of compounds for activity in either stimulating O1-180, O1-184 or O1-236, overcoming the lack of O1-180, O1-184 or O1-236 or blocking or inhibiting the effect of an O1-180, O1-184 or O1-236 molecule. These assays may make use of a variety of different formats and may depend on the kind of "activity" for which the screen is being conducted.

[0140] In one embodiment, the invention is to be applied for the screening of compounds that bind to the O1-180, O1-184 or O1-236 polypeptide or fragment thereof. The polypeptide or fragment may be either free in solution, fixed to a support, expressed in or on the surface of a cell. Either the polypeptide or the compound may be labeled, thereby permitting determining of binding.

[0141] In another embodiment, the assay may measure the inhibition of binding of O1-180, O1-184 or O1-236 to a natural or artificial substrate or binding partner. Competitive binding assays can be performed in which one of the agents (O1-180, O1-184 or O1-236, binding partner or compound) is labeled. Usually, the polypeptide will be the labeled species. One may measure the amount of free label versus bound label to determine binding or inhibition of binding.

[0142] Another technique for high throughput screening of compounds is described in WO 84/03564. Large numbers of small peptide test compounds are synthesized on a solid substrate, such as plastic pins or some other surface. The peptide test compounds are reacted

WO 02/088314

PCT/US02/13245

with O1-180, O1-184 or O1-236 and washed. Bound polypeptide is detected by various methods.

[0143] Purified O1-180, O1-184 or O1-236 can be coated directly onto plates for use in the aforementioned drug screening techniques. However, non-neutralizing antibodies to the polypeptide can be used to immobilize the polypeptide to a solid phase. Also, fusion proteins containing a reactive region (preferably a terminal region) may be used to link the O1-180, O1-184 or O1-236 active region to a solid phase.

[0144] Various cell lines containing wild-type or natural or engineered mutations in O1-180, O1-184 or O1-236 gene can be used to study various functional attributes of O1-180, O1-184 or O1-236 and how a candidate compound affects these attributes. Methods for engineering mutations are described elsewhere in this document, as are naturally-occurring mutations in O1-180, O1-184 or O1-236 that lead to, contribute to and/or otherwise cause infertility. In such assays, the compound would be formulated appropriately, given its biochemical nature, and contacted with a target cell. Depending on the assay, culture may be required. The cell may then be examined by virtue of a number of different physiologic assays. Alternatively, molecular analysis may be performed in which the function of O1-180, O1-184 or O1-236, or related pathways, may be explored.

[0145] In a specific embodiment, yeast two-hybrid analysis is performed by standard means in the art with the polypeptides of the present invention, *i.e.*, O1-180, O1-184 or O1-236. Two hybrid screen is used to elucidate or characterize the function of a protein by identifying other proteins with which it interacts. The protein of unknown function, herein referred to as the "bait" is produced as a chimeric protein additionally containing the DNA binding domain of GAL4. Plasmids containing nucleotide sequences which express this chimeric protein are transformed into yeast cells, which also contain a representative plasmid from a library containing the GAL4 activation domain fused to different nucleotide sequences encoding different potential target proteins. If the bait protein physically interacts with a target protein, the GAL4 activation domain and GAL4 DNA binding domain are tethered and are thereby able to act conjunctively to promote transcription of a reporter gene. If no interaction occurs between the bait protein and the potential target protein in a particular cell, the GAL4 components remain separate and unable to promote reporter gene transcription on their own. One skilled in the art is aware that different reporter genes can be utilized, including  $\beta$ -

WO 02/088314

PCT/US02/13245

galactosidase, HIS3, ADE2, or URA3. Furthermore, multiple reporter sequences, each under the control of a different inducible promoter, can be utilized within the same cell to indicate interaction of the GAL4 components (and thus a specific bait and target protein). A skilled artisan is aware that use of multiple reporter sequences decreases the chances of obtaining false positive candidates. Also, alternative DNA-binding domain/activation domain components may be used, such as LexA. One skilled in the art is aware that any activation domain may be paired with any DNA binding domain so long as they are able to generate transactivation of a reporter gene. Furthermore, a skilled artisan is aware that either of the two components may be of prokaryotic origin, as long as the other component is present and they jointly allow transactivation of the reporter gene, as with the LexA system.

[0146] Two hybrid experimental reagents and design are well known to those skilled in the art (see *The Yeast Two-Hybrid System* by P. L. Bartel and S. Fields (eds.) (Oxford University Press, 1997), including the most updated improvements of the system (Fashena *et al.*, 2000). A skilled artisan is aware of commercially available vectors, such as the Matchmaker™ Systems from Clontech (Palo Alto, CA) or the HybriZAP® 2.1 Two Hybrid System (Stratagene; La Jolla, CA), or vectors available through the research community (Yang *et al.*, 1995; James *et al.*, 1996). In alternative embodiments, organisms other than yeast are used for two hybrid analysis, such as mammals (Mammalian Two Hybrid Assay Kit from Stratagene (La Jolla, CA)) or *E. coli* (Hu *et al.*, 2000).

[0147] In an alternative embodiment, a two hybrid system is utilized wherein protein-protein interactions are detected in a cytoplasmic-based assay. In this embodiment, proteins are expressed in the cytoplasm, which allows posttranslational modifications to occur and permits transcriptional activators and inhibitors to be used as bait in the screen. An example of such a system is the CytoTrap® Two-Hybrid System from Stratagene (La Jolla, CA), in which a target protein becomes anchored to a cell membrane of a yeast which contains a temperature sensitive mutation in the *cdc25* gene, the yeast homologue for hSos (a guanyl nucleotide exchange factor). Upon binding of a bait protein to the target, hSos is localized to the membrane, which allows activation of RAS by promoting GDP/GTP exchange. RAS then activates a signaling cascade which allows growth at 37°C of a mutant yeast *cdc25H*. Vectors (such as pMyr and pSos) and other experimental details are available for this system to a skilled

WO 02/088314

PCT/US02/13245

artisan through Stratagene (La Jolla, CA). (See also, for example, U.S. Patent No. 5,776,689, herein incorporated by reference).

[0148] Thus, in accordance with an embodiment of the present invention, there is a method of screening for a peptide which interacts with O1-180, O1-184 or O1-236 comprising introducing into a cell a first nucleic acid comprising a DNA segment encoding a test peptide, wherein the test peptide is fused to a DNA binding domain, and a second nucleic acid comprising a DNA segment encoding at least part of O1-180, O1-184 or O1-236, respectively, wherein the at least part of O1-180, O1-184 or O1-236 respectively, is fused to a DNA activation domain. Subsequently, there is an assay for interaction between the test peptide and the O1-180, O1-184 or O1-236 polypeptide or fragment thereof by assaying for interaction between the DNA binding domain and the DNA activation domain. For example, the assay for interaction between the DNA binding and activation domains may be activation of expression of  $\beta$ -galactosidase.

[0149] An alternative method is screening of lambda.gt11, lambda.LZAP (Stratagene) or equivalent cDNA expression libraries with recombinant O1-180, O1-184 or O1-236. Recombinant O1-180, O1-184 or O1-236 or fragments thereof are fused to small peptide tags such as FLAG, HSV or GST. The peptide tags can possess convenient phosphorylation sites for a kinase such as heart muscle creatine kinase or they can be biotinylated. Recombinant O1-180, O1-184 or O1-236 can be phosphorylated with  $^{32}\text{P}$  or used unlabeled and detected with streptavidin or antibodies against the tags. lambda.gt11cDNA expression libraries are made from cells of interest and are incubated with the recombinant O1-180, O1-184 or O1-236, washed and cDNA clones which interact with O1-180, O1-184 or O1-236 isolated. Such methods are routinely used by skilled artisans. See, *e.g.*, Sambrook (*supra*).

[0150] Another method is the screening of a mammalian expression library in which the cDNAs are cloned into a vector between a mammalian promoter and polyadenylation site and transiently transfected in cells. Forty-eight hours later the binding protein is detected by incubation of fixed and washed cells with a labeled O1-180, O1-184 or O1-236. In this manner, pools of cDNAs containing the cDNA encoding the binding protein of interest can be selected and the cDNA of interest can be isolated by further subdivision of each pool followed by cycles of transient transfection, binding and autoradiography. Alternatively, the cDNA of interest can be isolated by transfecting the entire cDNA library into mammalian cells and panning the cells

WO 02/088314

PCT/US02/13245

on a dish containing the O1-180, O1-184 or O1-236 bound to the plate. Cells which attach after washing are lysed and the plasmid DNA isolated, amplified in bacteria, and the cycle of transfection and panning repeated until a single cDNA clone is obtained. See Seed *et al.*, 1987 and Aruffo *et al.*, 1987 which are herein incorporated by reference. If the binding protein is secreted, its cDNA can be obtained by a similar pooling strategy once a binding or neutralizing assay has been established for assaying supernatants from transiently transfected cells. General methods for screening supernatants are disclosed in Wong *et al.*, (1985).

[0151] Another alternative method is isolation of proteins interacting with the O1-180, O1-184 or O1-236 directly from cells. Fusion proteins of O1-180, O1-184 or O1-236 with GST or small peptide tags are made and immobilized on beads. Biosynthetically labeled or unlabeled protein extracts from the cells of interest are prepared, incubated with the beads and washed with buffer. Proteins interacting with the O1-180, O1-184 or O1-236 are eluted specifically from the beads and analyzed by SDS-PAGE. Binding partner primary amino acid sequence data are obtained by microsequencing. Optionally, the cells can be treated with agents that induce a functional response such as tyrosine phosphorylation of cellular proteins. An example of such an agent would be a growth factor or cytokine such as interleukin-2.

[0152] Another alternative method is immunoaffinity purification. Recombinant O1-180, O1-184 or O1-236 is incubated with labeled or unlabeled cell extracts and immunoprecipitated with anti- O1-180, O1-184 or O1-236 antibodies. The immunoprecipitate is recovered with protein A-Sepharose and analyzed by SDS-PAGE. Unlabelled proteins are labeled by biotinylation and detected on SDS gels with streptavidin. Binding partner proteins are analyzed by microsequencing. Further, standard biochemical purification steps known to those skilled in the art may be used prior to microsequencing.

[0153] Yet another alternative method is screening of peptide libraries for binding partners. Recombinant tagged or labeled O1-180, O1-184 or O1-236 is used to select peptides from a peptide or phosphopeptide library which interact with the O1-180, O1-184 or O1-236. Sequencing of the peptides leads to identification of consensus peptide sequences which might be found in interacting proteins.

[0154] The present invention also encompasses the use of various animal models. Thus, any identity seen between human and other animal O1-180, O1-184 or O1-236 provides an

WO 02/088314

PCT/US02/13245

excellent opportunity to examine the function of O1-180, O1-184 or O1-236 in a whole animal system where it is normally expressed. By developing or isolating mutant cells lines that fail to express normal O1-180, O1-184 or O1-236, one can generate models in mice that enable one to study the mechanism of O1-180, O1-184 or O1-236 and its role in oogenesis and embryonic development.

[0155] Treatment of animals with test compounds will involve the administration of the compound, in an appropriate form, to the animal. Administration will be by any route that could be utilized for clinical or non-clinical purposes, including but not limited to oral, nasal, buccal, rectal, vaginal or topical. Alternatively, administration may be by intratracheal instillation, bronchial instillation, intradermal, subcutaneous, intramuscular, intraperitoneal or intravenous injection. Specifically contemplated are systemic intravenous injection, regional administration via blood or lymph supply and intratumoral injection.

[0156] Determining the effectiveness of a compound *in vivo* may involve a variety of different criteria. Such criteria include, but are not limited to, increased fertility, decreased fertility or contraception.

[0157] In one embodiment of the invention, transgenic animals are produced which contain a functional transgene encoding a functional O1-180, O1-184 or O1-236 polypeptide or variants thereof. Transgenic animals expressing O1-180, O1-184 or O1-236 transgenes, recombinant cell lines derived from such animals and transgenic embryos may be useful in methods for screening for and identifying agents that induce or repress function of O1-180, O1-184 or O1-236. Transgenic animals of the present invention also can be used as models for studying disease states.

[0158] In one embodiment of the invention, an O1-180, O1-184 or O1-236 transgene is introduced into a non-human host to produce a transgenic animal expressing an O1-180, O1-184 or O1-236. The transgenic animal is produced by the integration of the transgene into the genome in a manner that permits the expression of the transgene. Methods for producing transgenic animals are generally described by Wagner and Hoppe (U.S. Patent 4,873,191; which is incorporated herein by reference), Brinster *et al.*, 1985; which is incorporated herein by reference in its entirety) and in "Manipulating the Mouse Embryo; A

WO 02/088314

PCT/US02/13245

Laboratory Manual" 2nd edition (eds., Hogan, Beddington, Costantini and Long, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994; which is incorporated herein by reference in its entirety).

[0159] It may be desirable to replace the endogenous O1-180, O1-184 or O1-236 by homologous recombination between the transgene and the endogenous gene; or the endogenous gene may be eliminated by deletion as in the preparation of "knock-out" animals. Typically, targeting vectors that contain a portion of the gene of interest and a selection marker are generated and transfected into embryonic stem (ES) cells. These targeting vectors are electroporated into the hprt-negative ES cell line and selected in HAT and FIAU. ES cells with the correct mutation are injected into blastocysts to generate chimeras and eventually heterozygotes and homozygotes for the mutant O1-180, O1-184 and O1-236 genes. Thus, the absence of O1-180, O1-184 or O1-236 in "knock-out" mice permits the study of the effects that loss of O1-180, O1-184 or O1-236 protein has on a cell *in vivo*.

[0160] As noted above, transgenic animals and cell lines derived from such animals may find use in certain testing experiments. In this regard, transgenic animals and cell lines capable of expressing wild-type or mutant O1-180, O1-184 or O1-236 may be exposed to test substances. These test substances can be screened for the ability to enhance wild-type O1-180, O1-184 or O1-236 expression and or function or impair the expression or function of mutant O1-180, O1-184 or O1-236.

#### F. Formulations and Routes for Administration to Patients

[0161] Where clinical applications are contemplated, it will be necessary to prepare pharmaceutical compositions - expression vectors, virus stocks, proteins, antibodies and drugs - in a form appropriate for the intended application. Generally, this will entail preparing compositions that are essentially free of pyrogens, as well as other impurities that could be harmful to humans or animals.

[0162] One will generally desire to employ appropriate salts and buffers to render delivery vectors stable and allow for uptake by target cells. Buffers also will be employed when recombinant cells are introduced into a patient. Aqueous compositions of the present invention comprise an effective amount of the vector to cells, dissolved or dispersed in a pharmaceutically acceptable carrier or aqueous medium. Such compositions also are referred to as inocula. The phrase "pharmaceutically or pharmacologically acceptable" refer to molecular entities and

WO 02/088314

PCT/US02/13245

compositions that do not produce adverse, allergic, or other untoward reactions when administered to an animal or a human. As used herein, "pharmaceutically acceptable carrier" includes any and all solvents, dispersion media, coatings, antibacterial and antifungal agents, isotonic and absorption delaying agents and the like. The use of such media and agents for pharmaceutically active substances is well known in the art. Except insofar as any conventional media or agent is incompatible with the vectors or cells of the present invention, its use in therapeutic compositions is contemplated. Supplementary active ingredients also can be incorporated into the compositions.

[0163] The active compositions of the present invention may include classic pharmaceutical preparations. Administration of these compositions according to the present invention will be via any common route so long as the target tissue is available via that route. This includes oral, nasal, buccal, rectal, vaginal or topical. Alternatively, administration may be by orthotopic, intradermal, subcutaneous, intramuscular, intraperitoneal or intravenous injection. Such compositions would normally be administered as pharmaceutically acceptable compositions, described supra.

[0164] The active compounds also may be administered parenterally or intraperitoneally. Solutions of the active compounds as free base or pharmacologically acceptable salts can be prepared in water suitably mixed with a surfactant, such as hydroxypropylcellulose. Dispersions can also be prepared in glycerol, liquid polyethylene glycols, and mixtures thereof and in oils. Under ordinary conditions of storage and use, these preparations contain a preservative to prevent the growth of microorganisms.

[0165] The pharmaceutical forms suitable for injectable use include sterile aqueous solutions or dispersions and sterile powders for the extemporaneous preparation of sterile injectable solutions or dispersions. In all cases the form must be sterile and must be fluid to the extent that easy syringability exists. It must be stable under the conditions of manufacture and storage and must be preserved against the contaminating action of microorganisms, such as bacteria and fungi. The carrier can be a solvent or dispersion medium containing, for example, water, ethanol, polyol (for example, glycerol, propylene glycol, and liquid polyethylene glycol, and the like), suitable mixtures thereof, and vegetable oils. The proper fluidity can be maintained, for example, by the use of a coating, such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersion and by the use of surfactants. The prevention of



WO 02/088314

PCT/US02/13245

the action of microorganisms can be brought about by various antibacterial and antifungal agents, for example, parabens, chlorobutanol, phenol, sorbic acid, thimerosal, and the like. In many cases, it will be preferable to include isotonic agents, for example, sugars or sodium chloride. Prolonged absorption of the injectable compositions can be brought about by the use in the compositions of agents delaying absorption, for example, aluminum monostearate and gelatin.

[0166] Sterile injectable solutions are prepared by incorporating the active compounds in the required amount in the appropriate solvent with various of the other ingredients enumerated above, as required, followed by filtered sterilization. Generally, dispersions are prepared by incorporating the various sterilized active ingredients into a sterile vehicle which contains the basic dispersion medium and the required other ingredients from those enumerated above. In the case of sterile powders for the preparation of sterile injectable solutions, the preferred methods of preparation are vacuum-drying and freeze-drying techniques which yield a powder of the active ingredient plus any additional desired ingredient from a previously sterile-filtered solution thereof.

[0167] As used herein, "pharmaceutically acceptable carrier" includes any and all solvents, dispersion media, coatings, antibacterial and antifungal agents, isotonic and absorption delaying agents and the like. The use of such media and agents for pharmaceutical active substances is well known in the art. Except insofar as any conventional media or agent is incompatible with the active ingredient, its use in the therapeutic compositions is contemplated. Supplementary active ingredients can also be incorporated into the compositions.

[0168] For oral administration the polypeptides of the present invention may be incorporated with excipients and used in the form of non-ingestible mouthwashes and dentifrices. A mouthwash may be prepared incorporating the active ingredient in the required amount in an appropriate solvent, such as a sodium borate solution (Dobell's Solution). Alternatively, the active ingredient may be incorporated into an antiseptic wash containing sodium borate, glycerin and potassium bicarbonate. The active ingredient also may be dispersed in dentifrices, including: gels, pastes, powders and slurries. The active ingredient may be added in a therapeutically effective amount to a paste dentifrice that may include water, binders, abrasives, flavoring agents, foaming agents, and humectants.

WO 02/088314

PCT/US02/13245

[0169] The compositions of the present invention may be formulated in a neutral or salt form. Pharmaceutically-acceptable salts include the acid addition salts (formed with the free amino groups of the protein) and which are formed with inorganic acids such as, for example, hydrochloric or phosphoric acids, or such organic acids as acetic, oxalic, tartaric, mandelic, and the like. Salts formed with the free carboxyl groups can also be derived from inorganic bases such as, for example, sodium, potassium, ammonium, calcium, or ferric hydroxides, and such organic bases as isopropylamine, trimethylamine, histidine, procaine and the like.

[0170] Upon formulation, solutions will be administered in a manner compatible with the dosage formulation and in such amount as is therapeutically effective. The formulations are easily administered in a variety of dosage forms such as injectable solutions, drug release capsules and the like. For parenteral administration in an aqueous solution, for example, the solution should be suitably buffered if necessary and the liquid diluent first rendered isotonic with sufficient saline or glucose. These particular aqueous solutions are especially suitable for intravenous, intramuscular, subcutaneous and intraperitoneal administration. In this connection, sterile aqueous media which can be employed will be known to those of skill in the art in light of the present disclosure. For example, one dosage could be dissolved in 1 ml of isotonic NaCl solution and either added to 1000 ml of hypodermoclysis fluid or injected at the proposed site of infusion, (see for example, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, pages 1035-1038 and 1570-1580). Some variation in dosage will necessarily occur depending on the condition of the subject being treated. The person responsible for administration will, in any event, determine the appropriate dose for the individual subject. Moreover, for human administration, preparations should meet sterility, pyrogenicity, general safety and purity standards as required by FDA Office of Biologics standards.

#### G. Examples

[0171] The following examples are included to demonstrate preferred embodiments of the invention. It should be appreciated by those of skill in the art that the techniques disclosed in the examples which follow represent techniques discovered by the inventor to function well in the practice of the invention, and thus can be considered to constitute preferred modes for its practice. However, those of skill in the art should, in light of the present disclosure, appreciate that many changes can be made in the specific embodiments which are

WO 02/088314

PCT/US02/13245

disclosed and still obtain a like or similar result without departing from the spirit and scope of the invention.

#### Example 1

##### Creation of a cDNA subtractive hybridization library

[0172] Ovaries from *Gdf9* knockout mice are histologically very different from wild-type ovaries due to the early block in folliculogenesis. In particular, one layer primary follicles are relatively enriched in *Gdf9* knockout ovaries and abnormal follicular nests are formed after oocyte loss. The inventors took advantage of these differences in ovary composition and related them to alterations in gene expression patterns to clone novel ovary-expressed transcripts which are upregulated in the *Gdf9* knockout ovaries.

[0173] Ovaries from either *Gdf9* knockout mice (C57BL/6/129SvEv hybrid) or wild-type mice were collected and polyA+ mRNA was made from each pool. Using a modified version of the CLONTECH PCR-Select Subtraction kit, the inventors generated a pBluescript SK+plasmid-based cDNA library which was expected to be enriched for sequences upregulated in the *Gdf9* knockout ovaries.

[0174] Ligations into the NotI site of pBluescript SK+ were performed with a low molar ratio of EagI-digested cDNA fragment inserts to vector to prevent multiple inserts into the vector. Transformations were performed, and > 1000 independent bacterial clones were picked and stored in glycerol at -80°C. The remainder of the ligation mix was stored at -80°C for future transformations.

#### Example 2

##### Initial sequence analysis of pOvary1 (pO1) Library inserts

[0175] The inventors performed sequence analysis of 331 inserts from the pO1 subtractive hybridization of cDNA library. An Applied Biosystems 373 DNA Sequencer was used to sequence these clones. BLAST searches the inventors performed using the National Center for Biotechnology Information databases. Novel sequences were analyzed for open reading frames and compared to previously identified novel sequences using DNASTAR analysis programs. A summary of the data is presented in Table 1. As shown, the majority of the

WO 02/088314

PCT/US02/13245

clones were known genes or matched mouse or human ESTs. 9.4% of the clones failed to match any known sequence in the database.

**Table 1.** Summary of database searches of pO1 cDNA clones

pO1 cDNA Matches	Number identified	Percentage
Known Genes	180	54.4%
Mouse /Human EST	120	36.2%
RARE ESTs (1 EST match)	(8)	(2.4%)
ESTs from 2-cell library	(3)	(0.9%)
No match	31	9.4%
Total	331	100%

**Example 3**  
**Expression analysis and cDNA screening of ovarian-expressed genes**

[0176] Northern blot analysis was performed on all cDNAs which failed to match sequences in any database. Additionally, sequences matching ESTs derived predominantly from mouse 2-cell embryo cDNA libraries (*e.g.*, O1-184, and O1-236) were analyzed. The rationale for analyzing this last group of ESTs was that mRNAs expressed at high levels in oocytes may persist until the 2-cell stage and may play a role in early embryonic development including fertilization of the egg or fusion of the male and female pronuclei.

[0177] The results of the initial screen of novel ovarian genes is presented in Table 2. Northern blot analysis of 23 clones demonstrated that 8 of these clones were upregulated in the *Gdf9* knockout ovary indicating that the subtractive hybridization protocol used was adequate. Northern blot analysis using total RNA isolated from either adult C57BL/6/129SvEv hybrid mice (the ovarian RNA) or Swiss WEBSTER mice (all other tissues) also demonstrated that four of these clones including 2 clones which matched ESTs sequenced from 2-cell libraries were only expressed in the ovary (Figure 1). The O1-236 fragment probe (749 bp) detected a transcript of approximately 1.0 kb (Figure 1). Several clones have so far been analyzed for their ovarian localization by *in situ* hybridization analysis (Figure 2). Clones O1-180, O1-184, and O1-236 were oocyte-specific and expressed in oocytes of primary (one-layer) preantral follicles through ovulation (Figure 2).

WO 02/088314

PCT/US02/13245

Table 2. Analysis of ovarian cDNAs with no known function

PO1 Cdna	Adult mRNA Expression	Upregulated in <i>Gdf9</i> knockout ovary	Database match	Further studies ( <i>in situ</i> hybridization; chromosomal mapping)
PO1 Cdna	Adult mRNA Expression	Upregulated in GDF-9-deficient ovary	Database match	Further studies ( <i>in situ</i> hybridization; chromosomal mapping)
24	Multiple	No	-	No
27	Multiple	Yes	-	Oocyte-specific by <i>in situ</i>
37	Multiple	Yes	-	No
70	Multiple	No	-	No
91			1 EST (2-cell)	
97	Multiple	No	?	No
101	Multiple	No	-	No
114	Multiple	No	-	No
110	Multiple	Yes	-	No
126	Multiple	Yes	-	No
180	Ovary- specific	Yes	-	Oocyte-specific by <i>in situ</i>
184	Ovary- specific	Yes	>1 EST (All 2- cell)	Oocyte-specific by <i>in situ</i>
186	Ovary- specific	Yes	-	Granulosa cell-specific by <i>in situ</i>
223	Multiple	No	-	No
224	Multiple	No	-	No
236	Ovary- specific	Yes	6 EST (2 c-cell and others)	Oocyte-specific by <i>in situ</i>
255	Multiple	No	"zinc-finger" domains	
279	Multiple	No	-	No
317	Multiple	No	-	No
330	Multiple	No	-	No
331	Multiple	No	-	No
332	Multiple	No	-	No
334	Multiple	No	-	No
371	Multiple	No	-	No

[0178] The O1-236 gene product was oocyte-specific (Figure 3). O1-236 was not expressed in oocytes of primordial (type 2) or small type 3a follicles (Pedersen *et al.*, 1968), but was first detected in oocytes of intermediate-size type 3a follicles and all type 3b follicles (*i.e.*, follicles with >20 granulosa cells surrounding the oocyte in largest cross-section). Expression of

WO 02/088314

PCT/US02/13245

the O1-236 mRNA persisted through the antral follicle stage. Interestingly, the oocyte-specific expression pattern of the O1-236 gene product paralleled the expression of other oocyte-specific genes which the inventors have studied including *Gdf9* (McGrath *et al.*, 1995) and bone morphogenetic protein 15 (Dube *et al.*, 1998).

**Example 4**  
**Cloning of *Npm2***

[0179] Wild-type ovary and *Gdf9* knockout ZAP Express ovary cDNA libraries were synthesized and were screened to isolate full-length cDNAs for the above-mentioned three clones. Each full-length cDNA was again subjected to database searches and analyzed for an open reading frame, initiation ATG, and protein homology. The full-length cDNAs approximate the mRNA sizes determined from Northern blot analysis. Database searches using the predicted amino acid sequence permitted the identification of important domains (*e.g.*, signal peptide sequences, transmembrane domains, zinc fingers, *etc.*) which are useful to define the possible function and cellular localization of the novel protein.

[0180] The O1-236 partial cDNA fragment identified in Example 1 was used to screen Matzuk laboratory ZAP Express (Stratagene) ovarian cDNA libraries generated from either wild-type or GDF-9 deficient ovaries as per manufacturer's instructions and as in Dube *et al.*, 1998). In brief, approximately 300,000 clones of either wild-type or GDF-9 knockout mouse ovary cDNA libraries were hybridized to [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dCTP random-primed probes in Church's solution at 63°C. Filters were washed with 0.1X Church's solution and exposed overnight at -80°C.

[0181] Upon primary screening of the mouse ovarian cDNA libraries, the O1-236 cDNA fragment detected 22 positive phage clones out of 300,000 screened. Two of these clones (236-1 and 236-3), which approximated the mRNA size and which were derived from the two independent libraries, were analyzed further by restriction endonuclease digestion and DNA sequence analysis. These independent clones form a 984 bp overlapping contig (excluding the polyA sequences) and encode a 207 amino acid open reading frame (Figure 4). Including the polyA tail, this sequence approximates the 1.0 kb mRNA seen by Northern blot analysis suggesting that nearly all of the 5' UTR sequence had been isolated. When the nucleotide sequence was subjected to public database search, no significant matches were derived.

WO 02/088314

PCT/US02/13245

However, database search with the 207 amino acid open reading frame demonstrated high homology with several nucleoplasmin homologs from several species. Interestingly, O1-236 showed highest homology with *Xenopus laevis* nucleoplasmin. At the amino acid level, O1-236 was 48% identical to *Xenopus laevis* nucleoplasmin (Figure 4). Based on this homology and the expression patterns of both gene products in oocytes, the inventors termed the gene *Npm2* since it was the mammalian ortholog of *Xenopus laevis* nucleoplasmin [called *Xnpm2* in (MacArthur *et al.*, 1997)]

[0182] Using the *Npm2* cDNA sequence to search the EST database, two human cDNA clones containing sequences homologous to the mouse *Npm2* were found. Sequence analysis of these two ESTs was performed. The two independent clones form a 923 bp overlapping contig which encoded a 214 amino acid open reading frame. At the amino acid level, human NPM2 was 48% and 67% identical to *Xnpm2* and mouse *Npm2*, respectively (Figure 5).

[0183] When the frog and mammalian NPM2 sequences were compared, several interesting features were realized. Nucleoplasmin had a bipartite nuclear localization signal consisting of KR-(X)10-KKKK (Dingwall *et al.*, 1987). Deletion of either of these basic amino acid clusters in nucleoplasmin prevented translocation to the nucleus (Robbins *et al.*, 1991). When the mouse and human NPM2 sequences were analyzed, this bipartite sequence was 100% conserved between the two proteins (Figure 5). Thus, mammalian NPM2 was predicated to translocate to the nucleus where it would primarily function.

[0184] Also, conserved between NPM2 and nucleoplasmin was a long stretch of negatively charged residues. Amino acids 125-144 of NPM2 and amino acids 128-146 of nucleoplasmin are mostly glutamic acid and aspartic acid residues, with 19 out of the 20 residues for NPM2 and 16 out of the 19 residues for nucleoplasmin either Asp or Glu. This region of *Xenopus laevis* nucleoplasmin has been implicated to bind the positively charged protamines and histones. Thus, a similar function for this acidic region of NPM2 was predicted.

[0185] The last obvious feature of the NPM2 and nucleoplasmin sequences was the high number of serine and threonine residues. The NPM2 sequence contained 19 serine and 17 threonines (*i.e.*, 17.2% of the residues) and nucleoplasmin had 12 serine and 11 threonine residues (*i.e.*, 11.5% of the residues). Multiple putative phosphorylation sites were predicted

WO 02/088314

PCT/US02/13245

from the NPM2 and nucleoplasmin sequences. Several putative phosphorylation sequences that were conserved between the two proteins are shown in Figure 5. Phosphorylation of nucleoplasmin was believed to increase its translocation to the nucleus and also its activity (Sealy *et al.*, 1986, Cotten *et al.*, 1986, Vancurova *et al.*, 1995, Leno *et al.*, 1996). Similarly, phosphorylation may also alter NPM2 activity. Thus, since both mouse and human NPM2 and *Xenopus laevis* nucleoplasmin are oocyte (and egg)-specific at the mRNA level and share highest identity, it was concluded that mammalian NPM2 and frog nucleoplasmin were orthologs.

#### **Example 5** **Structure of the *Npm2* gene**

[0186] The studies show that all three of the novel oocyte-specific cDNAs have open reading frames.

[0187] One of the full length *Npm2* cDNAs (clone 236-1) was used to screen a mouse 129/SvEv genomic library (Stratagene) to identify the mouse *Npm2* gene. 500,000 phage were screened and 12 positive were identified. Two of these overlapping phage clones, 236-13 and 236-14 (~37 kb of total genomic sequence), were used to determine the structure of the mouse *Npm2* gene. The mouse *Npm2* was encoded by 9 exons and spans ~6.6 kb (Figures 6 and 7A and 7B (SEQ ID NO: 7A)). Two moderate size introns (introns 4 and 5) contributed the majority of the gene size. The initiation ATG codon resided in exon 2 and the termination codon in exon 9. The splice donor and acceptor sites (Figures 7A and 7B (SEQ ID NO: 7)) matched well with the consensus sequences found in rodents, and all of the intron-exon boundaries conformed to the "GT-AG" rule (Senapathy *et al.*, 1990). A consensus polyadenylation signal sequence was found upstream of the polyA tracts which were present in the two isolated cDNAs (Figures 7A and 7B (SEQ ID NO: 7)).

#### **Example 6** **Chromosomal mapping of the mouse *Npm2* gene**

[0188] Chromosomal mapping of genes in the mouse identifies candidate genes associated with spontaneous or induced mouse mutations. To further aid in the functional analysis of the isolated novel ovary-specific cDNAs, these mouse genes were mapped using the Research Genetics Radiation Hybrid Panel. Table 3 shows the genes that have been mapped using this technique. Also, identification of the syntenic region on the human chromosome may



WO 02/088314

PCT/US02/13245

identify one or more of these novel ovarian genes as candidate genes for known human diseases which map to these regions.

**Table 3. Analysis of partial or full-length cDNAs**

pO1 cDNA	ORF	Database Homolog
O1-180	361 aa	No
O1-184	426	No
O1-236	207	Yes; <i>Xenopus laevis</i> nucleoplosmin homolog (81% similar)

[0189] To map the mouse *Npm2* gene, the inventors used the Research Genetics radiation hybrid panel, The Jackson Laboratory Backcross DNA Panel Mapping Resource, and The Jackson Laboratory Mouse Radiation Hybrid Database. Forward (SEQ.ID.NO.17: GCAAAGAAGCCAGTGACCAAGAAATGA) and reverse (SEQ.ID.NO.18: CCTGATCATG CAAATTTTATTGTGGCC) primers within the last exon were used to PCR amplify a 229 bp fragment from mouse but not hamster. Using these primers, the mouse *Npm2* gene was mapped to the middle of chromosome 14 (Figure 8). *Npm2* showed linkage to D14Mit32 with a LOD of 11.2 and also had a LOD of 7.8 to D14Mit203. This region was syntenic with human chromosome 8p21.

**Example 7**  
**Generation of knockout mice lacking novel ovary-expressed genes**

[0190] Using the gene sequences obtained above, the inventors generate a targeting vector to mutate the O1-180, O1-184 and O1-236 genes in embryonic stem (ES) cells. These targeting vectors are electroporated into the hprt-negative AB2.1 ES cell line and selected in HAT and FIAU. Clones are processed for Southern blot analysis and screened using 5' and 3' external probes. ES cells with the correct mutation are injected into blastocysts to generate chimeras and eventually heterozygotes and homozygotes for the mutant O1-180, O1-184 and O1-236 genes.

[0191] Since expression of O1-180, O1-184 and O1-236 was limited to the ovary, the inventors anticipate that these O1-180-knockout, O1-184-knockout and O1-236-knockout

WO 02/088314

PCT/US02/13245

mice are viable, but that females lacking these gene products can have fertility alterations (*i.e.*, be infertile, subfertile, or superfertile). Mutant mice are analyzed for morphological, histological and biochemical information relating to intraovarian proteins required for folliculogenesis, oogenesis, or fertilization using techniques well within the ability of the person of ordinary skill in the art. It is envisioned that the absence of these proteins can result in female mice having increased or decreased fertility. These studies will lead a search for human reproductive conditions with similar idiopathic phenotypes.

**Example 8**  
**Generation of O1-184 Transgenic Animals**

[0192] The O1-184 gene is flanked by genomic sequences and is transferred by microinjection into a fertilized egg. The microinjected eggs are implanted into a host female, and the progeny are screened for the expression of the transgene. Transgenic animals may be produced from the fertilized eggs from a number of animals including, but not limited to reptiles, amphibians, birds, mammals, and fish. These animals are generated to overexpress O1-184 or express a mutant form of the polypeptide.

**Example 9**  
**Ovarian-specific expression of mouse Npm2**

[0193] To define the cell-specific expression of the *Npm2* gene product, *in situ* hybridization analysis was performed using wild-type mouse ovaries.

[0194] *In situ* hybridization was performed as described previously (Albrecht *et al.*, 1997; Elvin *et al.*, 1999). Briefly, ovaries were dissected from C57Bl6/129SvEv mice and fixed overnight in 4% paraformaldehyde in PBS before processing, embedding in paraffin and sectioning at 5  $\mu$ m. The fragment O1-236 was used as the template for generating sense and antisense strands with [ $\alpha^{32}$ P]-dUTP using the Riboprobe T7/SP6 combination system (Promega). Hybridization was carried out at 50-55°C with  $5 \times 10^6$  cpm for each riboprobe per slide for 16 hours in 50% deionized formamide/0.3 M NaCl/20 mM Tris-HCl (pH 8.0)/5 mM EDTA/10 mM NaPO<sub>4</sub> (pH 8.0)/10% dextran sulphate/1xDenhardt's/0.5 mg/ml yeast RNA. High stringency washes were carried out in 2xSSC/50% formamide and 0.1X SSC at 65°C. Dehydrated sections were dipped in NTB-2 emulsion (Eastman Kodak, Rochester, NY) and exposed for 4-7 days at

WO 02/088314

PCT/US02/13245

40°C. After the slides were developed and fixed, they were stained with hematoxylin and mounted for photography.

[0195] The Npm2 gene product was oocyte-specific (Figures 9A and 9B). The probe demonstrates specific expression in all growing oocytes. Oocyte-specific expression is first seen in the early one layer primary follicle (type 3a), with higher expression in the one layer type 3b follicle and all subsequent stages including antral (an) follicles. The "sense" probe does not detect a signal for this oocyte-specific gene.

**Example 10**  
**Subcellular localization of NPM2**

[0196] The subcellular localization of NPM2 protein was determined by immunohistostaining of mouse ovaries with anti-NPM2 antibodies.

[0197] The cDNA encoding the full-length mouse NPM2 protein was amplified by PCR to introduce a BamHI site before the start codon and a XhoI site before the stop codon. This PCR fragment was cloned into pET-23b(+)(Novagen) to produce a His-tagged NPM2 protein and sequenced to confirm the absence of mutations. The recombinant NPM2 protein was purified as described in the pET System Manual (Novagen). Two goats were immunized with the purified His-tagged NPM2 to produce specific and high affinity antibodies.

[0198] Ovaries were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 2 h, processed, embedded in paraffin, and sectioned at 5 µm thickness. Goat anti-NPM2 polyclonal antiserum was diluted 1:2000 in Common Antibody Dilute (BioGenex). The pre-immune goat serum from the same goat was used as a control. All section were blocked for 10 min in Universal Blocking Reagent (BioGenex), and incubated with the primary antibody for 1 h at room temperature. NPM2 detection was accomplished using anti-goat biotinylated secondary antibody, streptavidin-conjugated alkaline phosphatase label and New Fuschin substrate (BioGenex Laboratories, Inc., San Ramon, CA).

[0199] One to eight-cell embryos and blastocysts were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 2 h in 96-well round bottom plate, washed with 0.85% saline, and embedded in a few drops of 1.5% agarose. The agarose-containing embryos were dehydrated, embedded in paraffin, and analyzed as described above.

WO 02/088314

PCT/US02/13245

[0200] Consistent with the expression pattern of *Npm2* mRNA, NPM2 protein was expressed in oocytes from type 3 to antral follicle stages. In randomly cycling mice, the anti-NPM2 antibody strongly and specifically stained the nucleus (Figure 9C). The oocyte nucleus is also called the germinal vesicle (GV). The preovulatory surge of luteinizing hormone (LH) accelerates the maturation of GV oocytes and promotes GV breakdown (GVB). When mice were injected with PMSG and hCG to induce superovulation, the NPM2 protein redistributes in the oocytes of antral follicles after germinal vesicle breakdown. In preovulatory GVB oocytes, the NPM2 was evenly distributed in the cytoplasm of the oocyte (Figure 9D). Since xNPM2 has been implied to play a role in sperm DNA decondensation and pronuclei formation after fertilization, this redistribution suggested that the cytoplasmic NPM2 was now properly positioned to interact with the sperm nucleus at the time of fertilization. To examine the NPM2 expression after fertilization, early embryos were fixed, sectioned and stained with anti-NPM2 antibodies. In zygotes, NPM2 began to translocate back to the nucleus. Figure 9E shows an intermediate stage in which one pronucleus was formed but other was not yet complete and some NPM2 was still present in the cytoplasm. At a later point (Figure 9F), all of the NPM2 was present in the pronuclei. In two-cell (Figure 9G) and eight-cell (Figure 9H) embryos, the antibody continued to detect the NPM2 protein exclusively in the nucleus. NPM2 continued to be detected at significantly reduced levels in blastocysts (embryonic day 3.5), but in embryonic day 6.5 embryos, NPM2 expression was undetectable.

#### Example 11

##### Targeted disruption of the mouse *Npm2* gene and generation of *Npm2* knockout mice

[0201] To study the role of NPM2 in mammalian oocyte development and early embryo development, the inventors disrupted the mouse *Npm2* locus using ES cell technology.

[0202] A targeting vector for *Npm2* was constructed to delete exons 2 and 3 and the splice junction of exon 4. The deletion targeting vector contains from left to right, 2.2 kb of 5' *Npm2* homology, a PGK-hprt expression cassette, 4.6 kb of 3' *Npm2* homology and an MC1-tk (thymidine kinase) expression cassette. The linearized *Npm2* targeting vector was electroporated into AB2.1 ES cells. ES cell clones were selected in M15 medium containing HAT (hypoxanthine, aminopterin and thymidine and FIAU [1-(2'-deoxy-2'-fluoro-B-D-arabinofuranosyl)-5'-iodouracil]. Culturing of ES cells and collection and injection of blastocysts have been previously described by Matzuk *et al.*, 1992. For genomic Southern blot analysis,

WO 02/088314

PCT/US02/13245

BglIII-digested DNA was transferred to GeneScreen Plus nylon membrane and probed with an external 190 bp PCR synthesized fragment corresponding to exon 9 sequence (3' probe). An internal 200 bp PCR synthesized fragment (49 bp exon 1 plus 150 bp 5' upstream sequence) was also used to distinguish the wild-type and *Npm2* null (*Npm2tm1Zuk*) alleles when DNA was digested with BamHI. A PCR-synthesized probe containing the 137 bp exon 2 sequence was used to verify that exon 2 was absent in mice homozygous for the *Npm2tm1Zuk* allele when DNA was digested with PstI. A single correctly targeted ES cell clone (named *Npm2*-118-B11) was expanded, and ES cells were injected into C57Bl/6 blastocysts to obtain chimeric mice which ultimately produced C57Bl6/129/SvEv hybrid and 129/SvEv inbred F1 progeny.

[0203] The targeting vector was constructed to delete exon 2 which contains the translation initiation codon and also exon 3 and the exon 4 splice junction (Figure 10A). Outside of exon 2, only one other ATG was present in the remaining sequence (exon 6), and this ATG was positioned downstream of the acidic domain and between the bipartite nuclear localization consensus sequence. Thus, this vector generated an *Npm2* null allele. F1 heterozygous (*Npm2tm1Zuk*/+; herein called *Npm2*<sup>+/−</sup>) mice were viable and fertile, and were intercrossed to investigate the developmental consequences of NPM2 absence. Genotype analysis of 230 F2 offspring from these intercrosses (Figure 10B; Table 4) was consistent with a normal Mendelian ratio of 1:2:1, and a similar number of male and female homozygotes (*Npm2*<sup>−/−</sup>) were produced. Therefore, *Npm2* homozygous mutant male and female mice were viable and appeared to have normal sexual differentiation demonstrating that *Npm2* was not required prior to birth.

Table 4. Heterozygous mating

	-/-	+/-	Wild type	Total
Male	27	71	19	117
Female	27	53	33	113
Total	54	124	52	230
%	23	54	23	100

[0204] To confirm that the mice genotyped as *Npm2* homozygotes lacked *Npm2*, a cDNA probe that hybridized to exon 2 of the wild-type *Npm2* gene was used for Southern blot analysis. As shown (Figure 10C), this probe failed to detect any signal in DNA derived from

WO 02/088314

PCT/US02/13245

homozygous (*Npm2*<sup>-/-</sup>) mice in which exon 2 had been deleted. Furthermore, *Npm2* immunohistochemical analysis was performed on *Npm2* homozygotes and controls. Whereas the expression of NPM2 protein was noted in the ovaries from the heterozygous controls (Figure 11A and 11C), no protein was detected in oocytes in the homozygote ovaries (Figure 11B and 11D). This confirmed that the *Npm2*tm1Zuk mutation was a null allele and that *Npm2* homozygotes were completely lacking NPM2 protein.

#### Example 12

##### Loss of *Npm2* results in female infertility and subfertility

[0205] To study the function of NPM2 in reproductive function, adult homozygous hybrid (C57Bl/6/129SvEv) male or female mice were intercrossed with control hybrid mice (C57Bl/6/129SvEv) mice. Consistent with the female-specific expression of *Npm2* mRNA and protein, *Npm2*<sup>-/-</sup> male mice were fertile and had no gross or histological defects in the testes (data not shown). Similarly, intercrosses of 10 female *Npm2* heterozygotes with heterozygous males during a 5-8 month period resulted in 53 litters with 8.55 offspring/litter (0.97 litters/month)(Table 5). In contrast, only 9 out of 12 *Npm2*<sup>-/-</sup> female mice became pregnant over a 5-8 month period resulting in 32 litters with an average of 2.75 offspring/litter (0.43 litters/month)(Table 5). Thus, deficiency of *Npm2* leads to subfertility and infertility in females but not males.

Table 5: Matings of *Npm2* Knockout Mice

Genotype of Parents		Mothers	Litters	Average Litter size (Mean ±SEM)	Litters/month (Mean ±SEM)
Male	Female				
+/-	X +/-	8	51	8.55 ± 0.34*	0.97 ± 0.03**
WT	X -/-	12***	32	2.75 ± 0.25*	0.43 ± 0.10**

\* P<0.001

\*\* P<0.005

\*\*\* Three mice are infertile

#### Example 13

##### Early cleavage defect in *Npm2*-null fertilized eggs

[0206] To determine the causes of the fertility defects in the *Npm2*<sup>-/-</sup> female mice, ovaries were first examined morphologically and histologically. There is no significant

WO 02/088314

PCT/US02/13245

difference between *Npm2<sup>-/-</sup>* and control ovaries at the gross or histological levels (Figure 11B and 11F). Normal folliculogenesis including the formation of corpora lutea were observed in the *Npm2<sup>-/-</sup>* ovaries suggesting that ovulation occurred in these mice.

[0207] To confirm that ovulation was occurring and to further study the cause of the infertility and subfertility of the *Npm2<sup>-/-</sup>* mice, pharmacological superovulation of wild-type, heterozygous, and homozygous mice was performed and the eggs were collected from the oviducts and cultured *in vitro*.

[0208] Immature (21-24 day old) females were injected intraperitoneally with 5 IU PMSG (pregnant mare serum gonadotropin) followed by injection of 5 IU hCG (human chorionic gonadotropin) to induce superovulation as described (Hogan *et al.*, 1994; Matzuk *et al.*, 1996). The injected mice were mated to wild-type male mice. Eggs were harvested the next morning from the oviducts of these mice. Cumulus cells were removed from the eggs by using 0.3 mg/ml hyaluronidase in M2 medium (Sigma). Eggs were cultured in M16 Medium (Sigma) covered with light paraffin oil in a humidified 37°C incubator with an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and 95% air (Hogan *et al.*, 1994).

[0209] For the staining of DNA, eggs were washed once in PBS, incubated in 4% paraformaldehyde in PBS containing 10 ug/ml bisbenzimidazole (Hoechst 33258) for 20 min at room temperature, washed twice with PBS, mounted with Fluoromount-G, and photographed by using fluorescence microscopy (Axioplan 2 imaging, Carl Zeiss).

[0210] Pregnant mare serum gonadotropin/human chorionic gonadotropin superovulation treatment of 21-24 day old mice resulted in similar numbers of eggs ovulated in *Npm2<sup>-/-</sup>* females compared to wild-type or heterozygote controls (Table 6). The eggs from *Npm2<sup>-/-</sup>* mice appear to be fertilized by spermatozoa normally because there were no significant differences between the *Npm2<sup>-/-</sup>* and controls in the formation of the second polar body, evidence of fertilization. However, there was a substantial defect in the cleavage of one cell embryos into two cell embryos in the *Npm2<sup>-/-</sup>* mice (Table 6, Figure 12A-12D). Besides a significant reduction in the number of two cell embryos, some bizarre, developmentally-abnormal embryos appeared during the 24 hours of *in vitro* culture (Figure 12B). Unlike control eggs (Figure 12C), *Npm2<sup>-/-</sup>* eggs could not progress to the four cell embryo stage the current *in vitro* culture assay (Figure 12D). Thus, the defect in the *Npm2<sup>-/-</sup>* mice appeared to result in a reduced viability of embryos.

WO 02/088314

PCT/US02/13245

Table 6: *In vitro* culture of eggs released by superovulation

Genotype	Number of females	Eggs (Mean $\pm$ SEM)	Presence of polar body (Mean $\pm$ SEM)	2 cell embryos (Mean $\pm$ SEM (%))
Wild type	7	14.4 $\pm$ 3.8	8.6 $\pm$ 1.4	7.3 $\pm$ 2.1** (50.5%)
<i>Npm2<sup>+/+</sup></i>	21	12.6 $\pm$ 2.1	6.9 $\pm$ 0.9	7.1 $\pm$ 1.3** (56.3%)
<i>Npm2<sup>-/-</sup></i>	15	15.7 $\pm$ 3.9	7.2 $\pm$ 1.7	1.3 $\pm$ 0.4** (8.3%)

\*Percentage of 2 cell embryos developed from total eggs

\*\* p&lt;0.001

## Example 14

## Structure of the O1-180 gene and O1-180 pseudogene

[0211] A ZAP-express mouse ovary cDNA library was screened to isolate the full-length O1-180 cDNA. Excluding the polyA tail, the full-length O1-180 cDNA is about 1.3kb, and encodes an open reading frame from nucleotides 26 to 1108. The O1-180 cDNA is homologous to several ESTs in the database, including ESTs in a mouse sixteen-cell embryo cDNA library (AU044294) and a mouse unfertilized egg cDNA library (AU023153). The polypeptide predicted from the O1-180 cDNA ORF consists of 361 amino acids, with a molecular mass of 40 kDa. Searching the public protein database failed to identify any known protein homologues. A bipartite nuclear localization signal was found at positions 333 to 350 (SEQ.ID.NO.19: Lys-Arg-Pro-His-Arg-Gln-Asp-Leu-Cys-Gly-Arg-Cys-Lys-Asp-Lys-Arg-Leu-Ser), strongly suggesting that O1-180 may migrate to the oocyte or embryo nucleus.

[0212] To clone the mouse O1-180 gene, a mouse genomic  $\lambda$  Fix II phage library generated from mouse 129SvEv strain was screened with the full length O1-180 cDNA. Twelve independent  $\lambda$  recombinant clones were isolated; eight of which were identified as unique clones and were further characterized by subcloning, Southern blot analysis, and sequencing. Surprisingly, only one genomic insert DNA starting 650 nucleotide upstream of exon 2 of the gene corresponded to the 3'-portion of the O1-180 gene. The remaining clones corresponded to a closely related gene, in which the exons share 98% identity with O1-180 cDNA. Based on the exon differences, O1-180 gene- and the related gene-specific primers were designed and reverse transcription-polymerase chain reactions (RT-PCR) were performed. cDNAs from 8-week-old C57 mouse tissues, including brain, heart, lung, spleen, liver, small intestine, stomach, kidney, uterus, testis, and ovary, were used as templates. Consistent with the Northern blot analysis, O1-



WO 02/088314

PCT/US02/13245

180 cDNA was amplified exclusively in the ovary; while the related gene cDNA was not detectable in any of the tissues. This indicated that the related gene isolated from the mouse genomic  $\lambda$  Fix II phage library was a pseudogene. A BAC 129SvJ mouse genomic library was screened by PCR with two sets of O1-180 gene-specific primers, and only one BAC clone was isolated. Sequencing of the entire coding region and exon-intron boundaries of the BAC and  $\lambda$  phage clones showed that both the O1-180 and the O1-180 pseudogene contained four exons and three introns (Figure 14). As shown in Figure 15, all of the exon-intron boundaries satisfied the GT-AG intron donor-acceptor splice rule. The major difference between the O1-180 gene and the pseudogene was a 13-nt gap in exon 1 of the pseudogene, which the inventors expect results in a frame shift and early termination in exon 2 of the pseudogene. The sequences of exon 2 in both the O1-180 gene and pseudogene were identical, and there are single base pair mutations in exons 3 and 4 (Figure 15) (SEQ ID NO:11 and SEQ ID NO:12).

**Example 15**  
**Mouse chromosome 5**

[0213] The whole genome-radiation hybrid panel T31 (McCarthy *et al.*, 1997) were purchased from Research Genetics (Huntsville, AL) and used according to the manufacturer's instruction. The panel was constructed by fusing irradiated mouse embryo primary cells (129aa) with hamster cells. Because the sequence of the hamster homologues for O1-180 is unknown, the inventors designed the reverse primers from the 3'-untranslated region of the murine sequence to minimize the risk of coamplification of the hamster homologues (Makalowski and Boguski, 1998). O1-180 gene specific primers were (SEQ.ID.NO.20) 5'-CTAGAAAAGGGGACTGTAGTCACT-3' forward, and (SEQ.ID.NO.21) 5'-TGCATCTCCACACAAGTCTTGCC-3' reverse; pseudo O1-180 gene specific primers were (SEQ.ID.NO.22) 5'-CTAGAAAAGGGGACTATAGGCACC-3' forward, and (SEQ.ID.NO.23) 5'-TGCATCTCTCACACAAGTGTGCT-3' reverse. Specificity of the two sets of primers was tested with A23 hamster DNA and 129 mouse DNA. The PCR reactions were performed in 15 $\mu$ l final volume, containing 1 $\mu$ l of each panel DNA, 1.25u of Taq platinum DNA polymerase (Gibco, Rockville, MD), companion reagents (0.25mM dNTPs, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 1xPCR buffer), and 0.4 $\mu$ M of each primer. An initial denaturation step of 4 min at 94°C was followed by amplification for 30 cycles (40s at 94°C, 30s at 60°C, and 30s at 72°C) and final elongation at 72°C for 7min.

WO 02/088314

PCT/US02/13245

[0214] Both O1-180 gene and O1-180 pseudogene specific primers were designed respectively, and all 100 of the cell line DNAs of the T31 Mouse Radiation Hybrid Panel were screened by PCR in a duplicate assay. The data for each gene were submitted for analysis at the Jackson Laboratory Mouse Radiation Hybrid Mapper Server. Both genes were placed in the same region on mouse Chromosome 5. The O1-180 locus is at 40cM, between two markers D5Buc48 and Txk, while the O1-180 pseudogene lies at 41cM, between Tec and D5Mit356, just distal to the coding locus (Figure 16). This is syntenic to a region in humans Chromosome 4p12.

**Example 16**  
**Localization of O1-180 in mouse ovaries**

[0215] *In situ* hybridization was performed with the O1-180 specific probe. [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S]UTP-labeled antisense and sense probes were generated by the Riboprobe T7/T3 combination system (Promega, Madison, WI). Hybridization was carried out according to methods described by Albrecht *et al.*, 1997 and Elvin *et al.*, 1999A.

[0216] *In situ* hybridization showed high level expression of O1-180 localized to the oocytes within these ovaries. The expression of O1-180 within oocytes was evident at the one-layer (primary) follicle stage through the antral follicle stage, but no expression was observed at the primordial follicle stage. Because the number of follicles is increased in *Gdf9* knockout ovaries due to the arrest of follicle development at the primary follicle stage, more O1-180 positive oocytes were detected in each section (Figure 13).

**Example 17**  
**Analysis of O1-180**

[0217] Northern blot analysis was performed using standard techniques well known and used in the art. Briefly, ovarian mRNA was isolated from wildtype and GDF-9(-/-) mice. Figure 18 shows that O1-180 is specific for ovarian tissue.

[0218] Western blot analysis was performed using standard techniques well known and used in the art. Briefly, ovarian protein was isolated from wildtype and GDF-9(-/-) mice. Antibodies to O1-180 were used to compare the size of the recombinant O1-180 protein to a native O1-180 protein. Figure 19 revealed that the recombinant O1-180 protein is similar in size to the native O1-180 protein from isolated ovaries from GDF-9(-/-) mice.

WO 02/088314

PCT/US02/13245

**Example 18**  
**Subcellular localization of O1-180**

[0219] The subcellular localization of O1-180 protein was determined by immunohistostaining of mouse ovaries with anti-O1-180 antibodies.

[0220] The cDNA encoding the full-length mouse O1-180 protein was amplified by PCR to introduce a BamHI site before the start codon and a XhoI site before the stop codon. This PCR fragment was cloned into pET-23b(+)(Novagen) to produce a His-tagged O1-180 protein and sequenced to confirm the absence of mutations. The recombinant O1-180 protein was purified as described in the pET System Manual (Novagen). Two goats were immunized with the purified His-tagged O1-180 to produce specific and high affinity antibodies.

[0221] Ovaries were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 2 h, processed, embedded in paraffin, and sectioned at 5  $\mu$ m thickness. Goat anti- O1-180 polyclonal antiserum was diluted 1:2000 in Common Antibody Dilute (BioGenex). The pre-immune goat serum from the same goat was used as a control. All section were blocked for 10 min in Universal Blocking Reagent (BioGenex), and incubated with the primary antibody for 1 h at room temperature. Npm2 detection was accomplished using anti-goat biotinylated secondary antibody, streptavidin-conjugated alkaline phosphatase label and New Fuschin substrate (BioGenex Laboratories, Inc., San Ramon, CA).

[0222] Figure 20 shows immunostaining of O1-180 in mouse ovaries. As shown in Figure 20, the O1-180 protein was localized specifically to the cytoplasm of mouse oocytes and zygotes but disappeared after this point.

**Example 19**  
**Generation of O1-180 knockout mice**

[0223] A targeting vector to mutate the O1-180 gene was constructed from the isolated sequences (Figure 17). To study the role of O1-180 in mammalian oocyte development and early embryo development, the inventors disrupted the mouse O1-180 locus using ES cell technology. The targeting vector was constructed to delete exon 1 which contains the translation initiation codon. Thus, this vector generated an O1-180 null allele.

WO 02/088314

PCT/US02/13245

**Example 20**  
**Loss of O1-180 results in female infertility and subfertility**

[0224] To study the function of O1-180 in reproductive function, adult homozygous hybrid (C57Bl/6/129/vEv) male or female mice were intercrossed with control hybrid mice (C57Bl/6/129/SvEv) mice. Consistent with the female-specific expression of O1-180 mRNA and protein, O1-180<sup>-/-</sup> male mice are fertile and had no gross or histological defects in the testes. Similarly, intercrosses of female O1-180 heterozygotes with heterozygous males during a 5-8 month period resulted in 7.1 offspring/litter (Table 7). In contrast, none of the O1-180<sup>-/-</sup> female mice became pregnant over a 5-8 month period (Table 7). Thus, deficiency of O1-180 leads to subfertility and infertility in females but not males.

**Table 7. Fertility of O1-180 Mice**

Breeder		Average Litter Size (pups/litter)	Sex Ratio (Female/Male)	Genotype of Pups		
F	M			Wt	+/-	-/-
+/-	+/-	7.1	1 (119/114)	53(23%)	121 (52%)	59 (25%)
+/-	-/-	8.8	0.94 (103/109)	0	111(52%)	101 (48%)
-/-	+/- or Wt	0				

**Example 21**  
**Defect in O1-180-null fertilized eggs**

[0225] To determine the causes of the fertility defects in the O1-180<sup>-/-</sup>, O1-180<sup>+/-</sup> female mice, ovaries were first examined morphologically and histologically.

[0226] To confirm that ovulation was occurring and to further study the cause of the infertility and subfertility of the O1-180<sup>-/-</sup>, O1-180<sup>+/-</sup> mice, pharmacological superovulation of wild-type, heterozygous, and homozygous mice was performed and the eggs were collected from the oviducts and cultured *in vitro*. As shown in Figure 21 and Table 8, by day 2, only a few O1-180<sup>-/-</sup> zygotes developed to 2-cell stage and none of them developed to a 4-cell stage by day 3. This was in contrast to the O1-180<sup>+/-</sup> zygotes which most of them developed to a 2-cell embryo by day 2 and of these most of them developed into blastocysts by day 3 and day 4. Thus, the defect in the O1-180<sup>-/-</sup> mice appeared to initiate after fertilization and before the development of the blastocyst.

WO 02/088314

PCT/US02/13245

**Table 8: Embryonic Development of O1-180 Mutant Mice *in vivo***

	O1-180 +/- (n=8)			O1-180 -/- (n=13)		
	Total Zygotes (D1)	2-4-cell (D2)	>4-cell (D3)	Total Zygotes (D1)	2-4-cell (D2)	>4-cell (D3)
Mean	31.63	28.25	23.63	34.31	7.15	0.00
SD %	13.51	11.70	13.60	14.84	5.44	0.00
SEM		83.30	74.70		20.83	0.00
	4.78	4.14	4.81	4.12	1.51	0

**Example 22**  
**Two-hybrid analysis**

[0227] Two hybrid screen is used to elucidate or characterize the function of a protein by identifying other proteins with which it interacts.

[0228] The protein O1-180 or O1-236 or O1-184 is made into a chimeric protein, which contains a DNA binding domain of GAL4 along with the DNA for the protein of interest. Plasmids containing nucleotide sequences which express this chimeric protein are transformed into eukaryotic cells, which also contain a representative plasmid from a library containing the GAL4 activation domain fused to different nucleotide sequences encoding different potential target proteins. If the protein of interest (O1-180, O1-236 or O1-184) physically interacts with a target protein, the GAL4 activation domain and GAL4 DNA binding domain are tethered and are thereby able to act conjunctively to promote transcription of a reporter gene. If no interaction occurs between the O1-180, O1-236 or O1-184 protein and the potential target protein in a particular cell, the GAL4 components remain separate and unable to promote reporter gene transcription on their own.

[0229] Although the present invention and its advantages have been described in detail, it should be understood that various changes, substitutions and alterations can be made herein without departing from the spirit and scope of the invention as defined by the appended claims. Moreover, the scope of the present application is not intended to be limited to the particular embodiments of the process, machine, manufacture, composition of matter, means, methods and steps described in the specification. As one of ordinary skill in the art will readily appreciate from the disclosure of the present invention, processes, machines, manufacture, compositions of matter, means, methods, or steps, presently existing or later to be developed that

WO 02/088314

PCT/US02/13245

perform substantially the same function or achieve substantially the same result as the corresponding embodiments described herein may be utilized according to the present invention. Accordingly, the appended claims are intended to include within their scope such processes, machines, manufacture, compositions of matter, means, methods, or steps.

#### REFERENCES

[0230] The following references, to the extent that they provide exemplary procedural or other details supplementary to those set forth herein, are specifically incorporated herein by reference:

- Albrecht, U., *et al.*, (1997). In *Molecular and Cellular Methods in Developmental Toxicology*, G. P. Daston, ed. (Boca Raton, FL, CRC Press), pp. 23-48.
- Burglin, T., *et al.*, (1987). *Genes Dev* 1, 97-107.
- Carabatsos M., *et al.*, (1998). *Dev. Biol.* 203, 373-384.
- Chan, W. Y., *et al.*, (1989). *Biochemistry* 28, 1033-9.
- Channing, C.P., (1970). *Recent Prog. Horm. Res.* 26, 589-622.
- Cotten, M., *et al.*, (1986). *Biochemistry* 25, 5063-5069.
- Crevel, G., *et al.*, (1997). *J Struct Biol* 118, 9-22.
- Dilworth, S., *et al.*, (1987). *Cell* 51, 1009-1018.
- Dimitrov, S., and Wolffe, A. (1996). *EMBO Journal* 15, 5897-5906.
- Dingwall, C., *et al.*, *EMBO J* 6, 69-74.
- Dong, J., *et al.*, (1996). *Nature* 383, 531-535.
- Dube, J. L., *et al.*, (1998). *Molecular Endocrinology* 12, 1809-1817.
- Earnshaw, W., *et al.*, (1980). *Cell* 21, 373-383.
- El-Fouly, M.A., *et al.*, 1970. *Endocrinology* 87, 288-293.
- Elvin, J. A., and Matzuk, M. M. (1998). *Reviews of Reproduction* 3, 183-195.
- Elvin, J. A., *et al.*, (1999). *Mol Endocrinol* 13, 1018-34.
- Elvin, J. A., *et al.*, (2000). *Mol Cell Endocrinol* 159, 1-5.
- Elvin, J.A., *et al.*, 1999B. *Mol. Endocrinol.* 13, 1035-1048.
- Elvin, J.A., *et al.*, 2000. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 10288-10293.
- Hogan, B., *et al.*, (1994). *Manipulating the mouse embryo-a laboratory manual*.
- Howell CY *et al.*, *Cell* 104:829-38.
- Ito, T., Tyler, *et al.*, (1996). *J Biol Chem* 271, 25041-8.

WO 02/088314

PCT/US02/13245

- Iwata, K., *et al.*, (1999). *Int J Biol Macromol* 26, 95-101.
- Krohne, G., and Franke, W. (1980a). *Proc Natl Acad Sci* 77, 1034-1038.
- Kumar, T. (1994). *Human Rep* 9, 578-585.
- Kumar, T. R., *et al.*, (1997). *Nature Genetics* 15, 201-204.
- Laskey, R., *et al.*, (1993). *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 339, 263-269.
- Leno, G., *et al.*, (1996). *J Biol Chem* 271, 7253-7256.
- MacArthur, C. A., and Shackleford, G. (1997a). *Genomics* 42, 137-40.
- Maeda Y *et al.*, *Zygote* 6:39-45
- Maeda, Y., *et al.*, (1998). *Zygote* 6, 39-45.
- Mahmoudi, M., and Lin, V. K. (1989). *Biotechniques* 7, 331-332.
- Matzuk, *et al.*, (1992). *Nature* 360, 313-319.
- Matzuk, M. M., *et al.*, (1995). *Nature* 374, 356-360.
- Matzuk, M. M., *et al.*, (1996). *Recent Prog Horm Res* 51, 123-54.
- McGrath, S. A., *et al.*, (1995). *Molecular Endocrinology* 9, 131-136.
- McLay, D., and Clarke, H. (1997). *Dev Biol* 186, 73-84.
- Meric, F., Matsumoto, *et al.*, (1997). *J Biol Chem* 272, 12840-12846.
- Mills, A., *et al.*, (1980). *J Mol Biol* 139, 561-568.
- Nishimori, K., and Matzuk, M. M. (1996). *Reviews of Reproduction* 1, 203-212.
- Ohsumi, K., and Katagiri, C. (1991). *Dev Biol* 148, 295-305.
- Pedersen, T., and Peters, H. (1968). *Journal of Reproduction and Fertility* 17, 555-557.
- Perreault, S. (1992). *Mutat Res* 296, 43-55.
- Philpott, A., and Leno, G. (1992). *Cell* 69, 759-767.
- Philpott, A., *et al.*, (1991). *Cell* 65, 569-578.
- Robbins, J., *et al.*, (1991). *Cell* 64, 615-623.
- Schmidt-Zachmann, M. S., and Franke, W. W. (1988). *Chromosoma* 96, 417-26.
- Sealy, L., *et al.*, *Biochemistry* 25, 3064-3072.
- Senapathy, P., *et al.*, *Methods Enzymol* 183, 252-278.
- Service, R. (1996). *Science* 272, 1258.
- Tong ZB *et al.*, *Nat Genet* 26:267-8.
- Vancurova, I., *et al.*, (1995). *J Cell Sci* 108, 779-787.
- Vanderhyden, B.C., *et al.*, (1993) *Endocrinology* 133, 423-426.
- Zuccotti M, *et al.*, *J Endocrinol Invest* 23:623-9.

WO 02/088314

PCT/US02/13245

## CLAIMS

What is claimed is:

1. An isolated polynucleotide sequence comprising a nucleic acid sequence of SEQ.ID.NO:11.
2. An isolated polynucleotide sequence comprising a nucleic acid sequence of SEQ.ID.NO:13.
3. A pharmaceutical composition comprising a modulator of O1-180 expression dispersed in a pharmaceutically acceptable carrier.
4. The composition of sentence 3, wherein the modulator suppresses transcription of an *O1-180* gene.
5. The composition of sentence 3, wherein the modulator enhances transcription of an *O1-180* gene.
6. The composition of sentence 3, wherein the modulator is a polypeptide.
7. The composition of sentence 3, wherein the modulator is a small molecule.
8. The composition of sentence 3, wherein the modulator is a polynucleotide sequence.
9. The composition of sentence 9, wherein the polynucleotide sequence is DNA or RNA.
10. The composition of sentence 9 further comprising an expression vector, wherein the expression vector comprises a promoter and the polynucleotide sequence, operatively linked.
11. A pharmaceutical composition comprising a modulator of O1-180 activity dispersed in a pharmaceutically acceptable carrier.
12. The composition of sentence 11, wherein the composition inhibits O1-180 activity.



WO 02/088314

PCT/US02/13245

13. The composition of sentence 11, wherein the composition stimulates O1-180 activity.
14. A method of modulating contraception comprising administering to an animal an effective amount of a modulator of O1-180 activity dispersed in a pharmacologically acceptable carrier, wherein said amount is capable of decreasing conception.
15. The method of sentence 14, wherein the animal is female.
16. The method of sentence 14, wherein the animal is male.
17. A method of enhancing fertility comprising administering to an animal an effective amount of a modulator of O1-180 activity dispersed in a pharmacologically acceptable carrier, wherein said amount is capable of increasing conception.
18. A method of screening for a modulator of O1-180 activity comprising the steps of:  
  
providing a cell expressing an O1-180 polypeptide  
contacting said cell with a candidate modulator;  
measuring O1-180 expression; and  
  
comparing said O1-180 expression in the presence of said candidate modulator with the expression of O1-180 expression in the absence of said candidate modulator; wherein a difference in the expression of O1-180 in the presence of said candidate modulator, as compared with the expression of O1-180 in the absence of said candidate modulator, identifies said candidate modulator as a modulator of O1-180 expression.
19. A method of identifying compounds that modulate the activity of O1-180 comprising the steps of:  
  
obtaining an isolated O1-180 polypeptide or functional equivalent thereof;

WO 02/088314

PCT/US02/13245

- administering the O1-180 polypeptide or functional equivalent thereof with a candidate compound;
- and measuring an effect of said candidate compound on the activity of O1-180.
20. A method of screening for a compound which modulates the activity of O1-180 comprising:
- exposing O1-180 or a O1-180 binding fragment thereof to a candidate compound;
  - and
  - determining whether said compound binds to O1-180 or the O1-180 binding partner thereof; and
  - further determining whether said compound modulates O1-180 or the O1-180 interaction with a binding partner.
21. A method of screening for an interactive compound which binds with O1-180 comprising:
- exposing a O1-180 protein, or a fragment thereof to a compound; and
  - determining whether said compound bound to the O1-180.
22. A method of identifying a compound that effects O1-180 activity comprising
- (a) providing a group of transgenic animals having (1) a regulatable one or more O1-180 protein genes, (2) a knock-out of one or more O1-180 protein genes, or (3) a knock-in of one or more O1-180 protein genes;
  - (b) providing a second group of control animals respectively for the group of transgenic animals in step (a); and
  - (c) exposing the transgenic animal group and control animal group to a potential O1-180-modulating compounds; and
  - (d) comparing the transgenic animal group and the control animal group and determining the effect of the compound on one or more proteins related to infertility or fertility in the transgenic animals as compared to the control animals.
23. A method of detecting a binding interaction of a first peptide and a second peptide of a peptide binding pair, comprising:

WO 02/088314

PCT/US02/13245

(i) culturing at least one eukaryotic cell under conditions suitable to detect the selected phenotype; wherein the cell comprises;

a) a nucleotide sequence encoding a first heterologous fusion

protein comprising the first peptide or a segment thereof joined to a transcriptional activation protein DNA binding domain;

b) a nucleotide sequence encoding a second heterologous

fusion protein comprising the second peptide or a segment thereof joined to a transcriptional activation protein transcriptional activation domain;

wherein binding of the first peptide or segment thereof and the second peptide or segment thereof reconstitutes a transcriptional activation protein; and

c) a reporter element activated under positive transcriptional control of the reconstituted transcriptional activation protein, wherein expression of the reporter element produces a selected phenotype;

(ii) detecting the binding interaction of the peptide binding pair by determining the level of the expression of the reporter element which produces the selected phenotype;

wherein said first or second peptide is an O1-180 peptide and the other peptide is a test peptide, preferably selected peptides/proteins present in the ovary.

24. A rescue screen for detecting the binding interaction of a first peptide and a second peptide of a peptide binding pair, comprising:

(i) culturing at least one eukaryotic cell under conditions to detect a selected phenotype or the absence of such phenotype, wherein the cell comprises;

a) a nucleotide sequence encoding a first heterologous fusion

protein comprising the first peptide or a segment thereof joined to a DNA binding domain of a transcriptional activation protein;

b) a nucleotide sequence encoding a second heterologous

fusion protein comprising the second peptide or a segment thereof joined to a transcriptional activation domain of a transcriptional activation protein;

WO 02/088314

PCT/US02/13245

wherein binding of the first peptide or segment thereof and the second peptide or segment thereof reconstitutes a transcriptional activation protein; and

c) a reporter element activated under positive transcriptional control of the reconstituted transcriptional activation protein, wherein expression of the reporter element prevents exhibition of a selected phenotype;

(ii) detecting the ability of the test peptide to interact with O1-180 by determining whether the test peptide affects the expression of the reporter element which prevents exhibition of the selected phenotype,

wherein said first or second peptide is an O1-180 peptide and the other peptide is a test peptide, preferably selected peptides/proteins present in the ovary.

25. A method of identifying binding partners for O1-180 comprising the steps of:
  - exposing the protein to a potential binding partner; and
  - determining if the potential binding partner binds to O1-180.
26. A pharmaceutical composition comprising a modulator of O1-236 expression dispersed in a pharmaceutically acceptable carrier.
27. The composition of sentence 26, wherein the modulator suppresses transcription of an *O1-236* gene.
28. The composition of sentence 26, wherein the modulator enhances transcription of an *O1-236* gene.
29. The composition of sentence 26, wherein the modulator is a polypeptide.
30. The composition of sentence 26, wherein the modulator is a small molecule.
31. The composition of sentence 26, wherein the modulator is a polynucleotide sequence.
32. The composition of sentence 31, wherein the polynucleotide sequence is DNA or RNA.
33. The composition of sentence 31 further comprising an expression vector, wherein the expression vector comprises a promoter and the polynucleotide sequence, operatively linked.
34. A pharmaceutical composition comprising a modulator of O1-236 activity dispersed in a pharmaceutically acceptable carrier.

WO 02/088314

PCT/US02/13245

35. The composition of sentence 34, wherein the composition inhibits O1-236 activity.
36. The composition of sentence 34, wherein the composition stimulates O1-236 activity.
37. A method of modulating contraception comprising administering to an animal an effective amount of a modulator of O1-236 activity dispersed in a pharmacologically acceptable carrier, wherein said amount is capable of decreasing conception.
38. The method of sentence 37, wherein the animal is female.
39. The method of sentence 37, wherein the animal is male.
40. A method of enhancing fertility comprising administering to an animal an effective amount of a modulator of O1-236 activity dispersed in a pharmacologically acceptable carrier, wherein said amount is capable of increasing conception.
41. A method of screening for a modulator of O1-236 activity comprising the steps of:
- providing a cell expressing an O1-236 polypeptide
  - contacting said cell with a candidate modulator;
  - measuring O1-236 expression; and
  - comparing said O1-236 expression in the presence of said candidate modulator with the expression of O1-236 expression in the absence of said candidate modulator; wherein a difference in the expression of O1-236 in the presence of said candidate modulator, as compared with the expression of O1-236 in the absence of said candidate modulator, identifies said candidate modulator as a modulator of O1-236 expression.
42. A method of identifying compounds that modulate the activity of O1-236 comprising the steps of:
- obtaining an isolated O1-236 polypeptide or functional equivalent thereof;
  - admixing the O1-236 polypeptide or functional equivalent thereof with a candidate compound;
  - and measuring an effect of said candidate compound on the activity of O1-236.
43. A method of screening for a compound which modulates the activity of O1-236 comprising:

WO 02/088314

PCT/US02/13245

- exposing O1-236 or a O1-236 binding fragment thereof to a candidate compound;  
and  
determining whether said compound binds to O1-236 or the O1-236 binding partner thereof; and  
further determining whether said compound modulates O1-236 or the O1-236 interaction with a binding partner.
44. A method of screening for an interactive compound which binds with O1-236 comprising:  
exposing a O1-236 protein, or a fragment thereof to a compound; and  
determining whether said compound bound to the O1-236.
45. A method of identifying a compound that effects O1-236 activity comprising  
(a) providing a group of transgenic animals having (1) a regulatable one or more O1-180 protein genes, (2) a knock-out of one or more O1-236 protein genes, or (3) a knock-in of one or more O1-236 protein genes;  
(b) providing a second group of control animals respectively for the group of transgenic animals in step (a); and  
(c) exposing the transgenic animal group and control animal group to a potential O1-236-modulating compounds; and  
(d) comparing the transgenic animal group and the control animal group and determining the effect of the compound on one or more proteins related to infertility or fertility in the transgenic animals as compared to the control animals.
46. A method of detecting a binding interaction of a first peptide and a second peptide of a peptide binding pair, comprising:  
(i) culturing at least one eukaryotic cell under conditions suitable to detect the selected phenotype; wherein the cell comprises;  
a) a nucleotide sequence encoding a first heterologous fusion  
protein comprising the first peptide or a segment thereof joined to a transcriptional activation protein DNA binding domain;

WO 02/088314

PCT/US02/13245

- b) a nucleotide sequence encoding a second heterologous fusion protein comprising the second peptide or a segment thereof joined to a transcriptional activation protein transcriptional activation domain;
- wherein binding of the first peptide or segment thereof and the second peptide or segment thereof reconstitutes a transcriptional activation protein; and
- c) a reporter element activated under positive transcriptional control of the reconstituted transcriptional activation protein, wherein expression of the reporter element produces a selected phenotype;
- (ii) detecting the binding interaction of the peptide binding pair by determining the level of the expression of the reporter element which produces the selected phenotype;
- wherein said first or second peptide is an O1-236 peptide and the other peptide is a test peptide, preferably selected peptides/proteins present in the ovary.
47. A rescue screen for detecting the binding interaction of a first peptide and a second peptide of a peptide binding pair, comprising:
- (i) culturing at least one yeast cell under conditions to detect a selected phenotype or the absence of such phenotype, wherein the yeast cell comprises;
- a) a nucleotide sequence encoding a first heterologous fusion protein comprising the first peptide or a segment thereof joined to a DNA binding domain of a transcriptional activation protein;
- b) a nucleotide sequence encoding a second heterologous fusion protein comprising the second peptide or a segment thereof joined to a transcriptional activation domain of a transcriptional activation protein;
- wherein binding of the first peptide or segment thereof and the second peptide or segment thereof reconstitutes a transcriptional activation protein; and
- c) a reporter element activated under positive transcriptional control of the reconstituted transcriptional activation protein, wherein expression of the reporter element prevents exhibition of a selected phenotype;

WO 02/088314

PCT/US02/13245

(ii) detecting the ability of the test peptide to interact with O1-236 by determining whether the test peptide affects the expression of the reporter element which prevents exhibition of the selected phenotype,

wherein said first or second peptide is an O1-236 peptide and the other peptide is a test peptide, preferably selected peptides/proteins present in the ovary.

48. A method of identifying binding partners for O1-236 comprising the steps of:

exposing the protein to a potential binding partner; and

determining if the potential binding partner binds to O1-236.



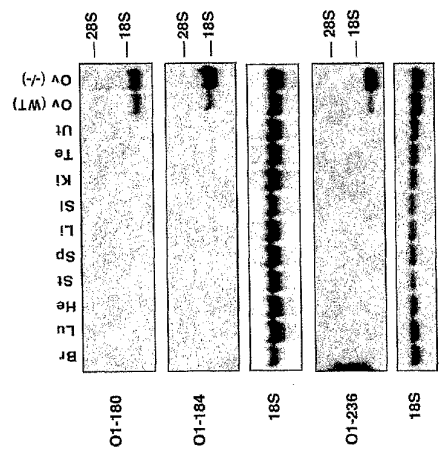


FIG. 1

WO 02/088314

PCT/US02/13245

2/26

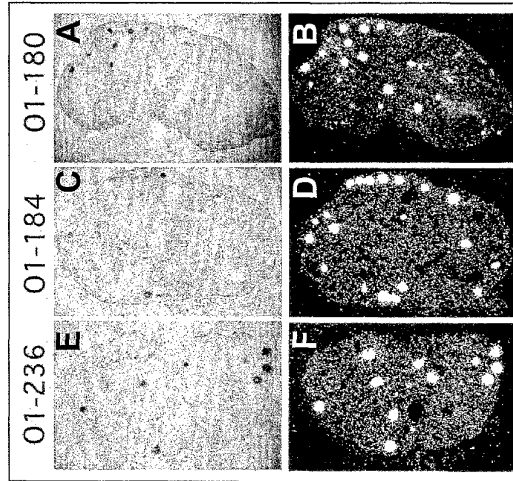


FIG. 2

WO 02/088314

PCT/US02/13245

3/26

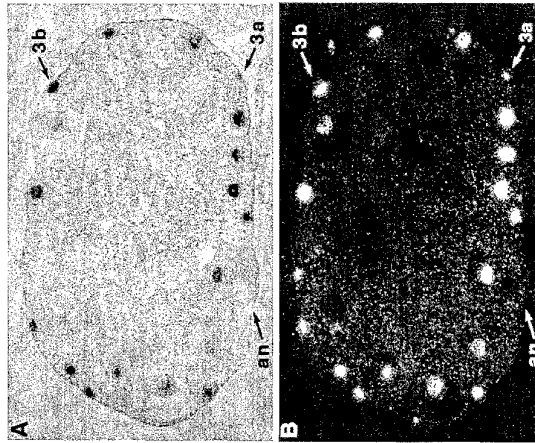


FIG. 3

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/088314

PCT/US02/13245

4/26

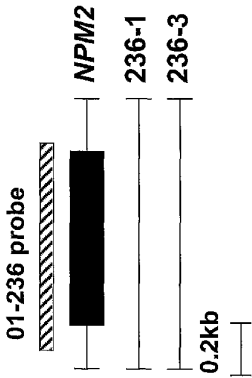


FIG. 4

WO 02/088314

PCT/US02/13245

hNPM2 **Q** N L S **A** T E K A V T T V **A** G E S Q R R **P** L G Q 40  
mNpm2 **M** S R H **S** T T T A K N M **W** G S H L N Q K Q C E E G G K K D 40  
xNpm2 **K** A S T V S N T S K L E K P V S L I **K** E E E N E Q D K F E E K V E - D D E E 39

hNPM2 **S** G - - R **L** H **G** L G E K A K E M H R V E L P P A N I Q D K M Q V 78  
mNpm2 **S** G - - K **L** S **G** L G E K A K L V N R V F V S - - O G R - P I 74  
xNpm2 **K** G E H Q A R V G L G D K A A D F N I **L** E V T Q E E G A E S V - - 77

hNPM2 **H** T A S H Q A S V A P E M V S N V G V Q S P P V T R Q E R G S G P V F L S G Q 118  
mNpm2 **L** T A T L K A S V L P M V T V S G C E L S P P V T F R L R T G S G P V F L S O L 114  
xNpm2 - **E** S A T L K P S I L P M A T M S G G F L T E P A V T E R L K A G S G E L Y I S G Q 116

hNPM2 **R** R N R A S D L E V F D L E L L G E E E E H D D D D D A D S L E E Q 158  
mNpm2 **C** T T O L A Y D D L **L** - - E E E E H D D D D A D S L E E - 149  
xNpm2 H V A M E E Y S W A E E D D L G E A G E E E P E H Q H S - - - 149

hNPM2 **S** P V K Q V K R L V P Q K Q A V K K K K L E X H E E H - - I A V R P K 196  
mNpm2 **I** P A V K Q V K R V P Q K Q M I K K K K V E K E D H T V V P P Q P K S 189  
xNpm2 - **P** K A K R P A T K G Q **K** K A S D D - - - S E E D 182

hNPM2 **V** K N A A A A K K G F 214  
mNpm2 **P** K K E S P P A K K P V T 207  
xNpm2 **P** T K K G G A G N G R K A A 200

FIG. 5

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

The diagram illustrates the structure of the human  $\alpha 2(I)$  procollagen gene. The gene is organized into exons (represented by boxes) and introns (represented by lines). The  $\alpha 2(I)$  chain coding sequence is located within exons 1 through 4, while the  $\alpha 1(I)$  chain coding sequence is located within exons 5 through 9. The gene is flanked by 5' and 3' non-coding regions. The  $\alpha 2(I)$  chain coding sequence is shown in a separate box, with exons 1-4 and introns 1-4. The  $\alpha 1(I)$  chain coding sequence is shown in a separate box, with exons 5-9 and introns 5-9. The gene structure is labeled with '236-14' and '236-13' indicating the positions of the  $\alpha 2(I)$  and  $\alpha 1(I)$  chains respectively. The  $\alpha 2(I)$  chain coding sequence is shown in a separate box, with exons 1-4 and introns 1-4. The  $\alpha 1(I)$  chain coding sequence is shown in a separate box, with exons 5-9 and introns 5-9. The gene structure is labeled with '236-14' and '236-13' indicating the positions of the  $\alpha 2(I)$  and  $\alpha 1(I)$  chains respectively.

FIG. 6A

WO 02/088314

PCT/US02/13245

7/26

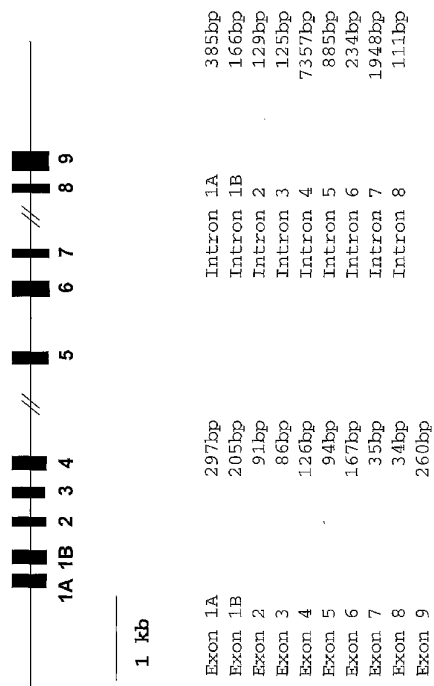


FIG. 6B

WO 02/088314

PCT/US02/13245

8/26

Mouse *Npm2* Gene Sequences  
acagcagaggtgatgctcagaatcaagtgttaacagaggccaggtg  
ctctagagtagggggatgacacotccccacccctctctttc  
ccaggcttcttaacagcctgtgtgggaagctgacctagatggagc  
cctgaaGCCATATTGAGGACCTGCAGTAGAGGTGGAACCCATGACTGG  
CAGCGCAgtaagctgagcagg... intron 1= 343bp  
...cttgcaattactcagAACACAGTGATAACAGCTGAGCTCCAAGCA  
AGGACCCAGGACCTTGCTCACCACAGACATAATCTTTCCCAACAACA  
CCTCCACCAAGCCGCCCTGTAATCGAC ATG AGT CGC CAC AGC  
1 M S R H S  
ACC AGC AGC GTG ACC GAA ACC ACA GCA AAA AAC ATG  
6 T S S V T E T T A K N M  
CTC TGG Ggtaagggctaagct... intron 2 = 134bp  
18 L W  
...gtcttcgctgtgcagGT AGT GAA CTC AAT CAG GAA AAG  
20 G S E L N Q E K  
CAG ACT TGC ACC TTT AGA GGC CAA TGC GAG AAG AAG  
28 Q T C T F R G Q C E K K  
GAC AGC TGT AAA CTC TTG CTC AGC ACggtgggtgtctccc  
40 D S C K L L L S T  
aa... intron 3 = 92bp ...catcacctttctcagATC  
49 I  
TGC CTG GGG GAG AAA GCC AAA GAG GAG GTG AAC CGT  
50 C L G E K A K E E V N R  
GTG GAA GTC CTC TCC CAG GAA GGC AGA AAA CCA CCA  
62 V E V L S Q E G R K P P  
ATC ACT ATT GCT ACG CTG AAG GCA TCA GTC CTG CCC  
74 I T I A T L K A S V L P  
ATGgtgagtctctctcc... intron 4 = 2.8kb ...agaa  
86 M  
gggggacacagGTC ACT GTG TCA GGT ATA GAG CTT TCT  
87 V T V S G I E L S  
CCT CCA GTA ACT TTT CGG CTC AGG ACT GGC TCA GGA  
96 P P V T F R L R T G S G

FIG. 7A

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)



WO 02/088314

PCT/US02/13245

9/26

CCT GTG TTC CTC AGT GGC CTG GAA TGT TAT Ggtaagtt  
 108 P V F L S G L E C Y  
 gtagccta... intron 5 = 1.35kb ...ggtaccattcc  
 agAG ACT TCG GAC CTG ACC TGG GAA GAT GAC GAG GAA  
 118 E T S D L T W E D D E E  
 GAG GAG GAA GAG GAG GAG GAA GAG GAT GAA GAT GAG  
 130 E E E E E E E E D E D E  
 GAT GCA GAT ATA TCG CTA GAG GAG ATA CCT GTC AAA  
 142 D A D I S L E E I P V K  
 CAA GTC AAA AGG GTG GCT CCC CAG AAG CAG ATG AGC  
 154 Q V K R V A P Q K Q M S  
 ATA GCA AAGgtgggggaaagaa... intron 6 = 186bp  
 166 I A K  
 ...tggtttttgtccagAAA AAG AAG GTG GAA AAA GAA  
 169 K K K V E K E  
 GAG GAT GAA ACA GTA GTG AGgtaattcatgcagtt...  
 176 E D E T V V R  
 intron 7 = 0.5kb ...ctattccctttccagG CCC AGC  
 183 P S  
 CCT CAG GAC AAG AGT CCC TGG AAG AAG gtgagcaataag  
 185 P Q D K S P W K K  
 aag... intron 8 = 92bp ...ctctatctgcacagGAG  
 194 E  
 AAA TCT ACA CCC AGA GCA AAG AAG CCA GTG ACC AAG  
 195 K S T P R A K K P V T K  
 AAA TGA CCTCATCTTAGCATCTTCTGCGTCCAAGGCAGGATGTCCA  
 207 K \*  
 GCAGCTGTGTTCTGGTGCAGGTGTCCAGCCCCACCACCTAGTCTGAA  
 TGAATAAGGTGGTGTGGCTGTAAACCTGTAAACCCAGCCCTCCAGTTT  
 CCGGAGGTTTTTGGTGAAGAGCCCCAGCAAGTTCGCCTAGGGCCACA  
 ATAAAAATTTCATGATCAGGacctccctctgctccccctccctggat  
 gggctctctgctgctgcatagctcaltgtcccagcagagggaacc  
 acgagcaugaaaccagccccatgt

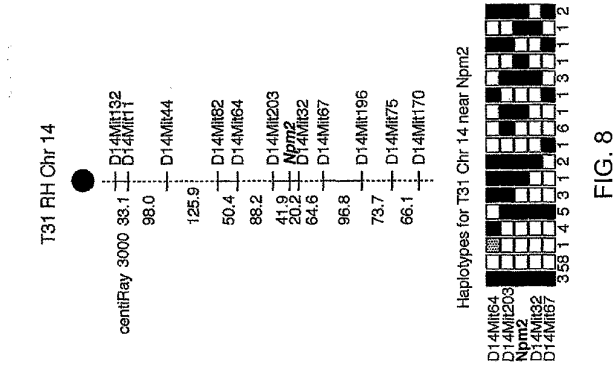
FIG. 7B

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/088314

PCT/US02/13245

10/26



WO 02/088314

PCT/US02/13245

11/26

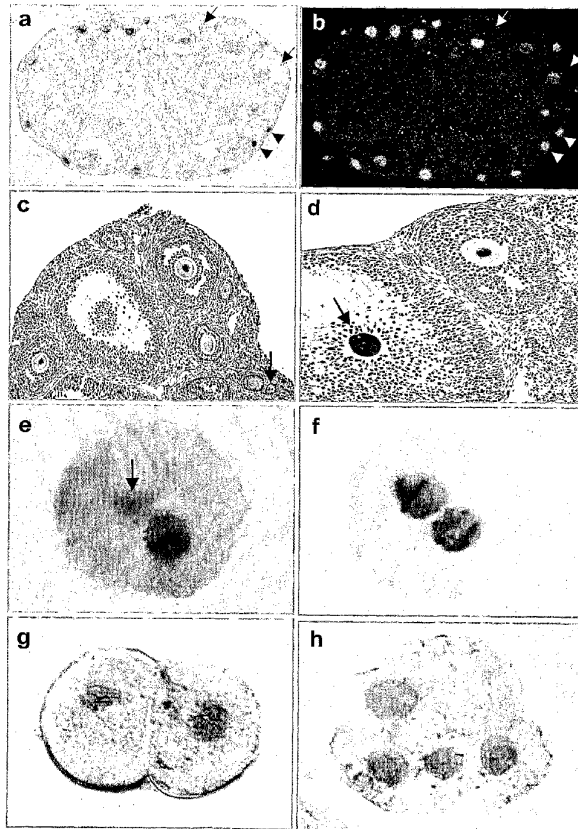


FIG.9

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/088314

PCT/US02/13245

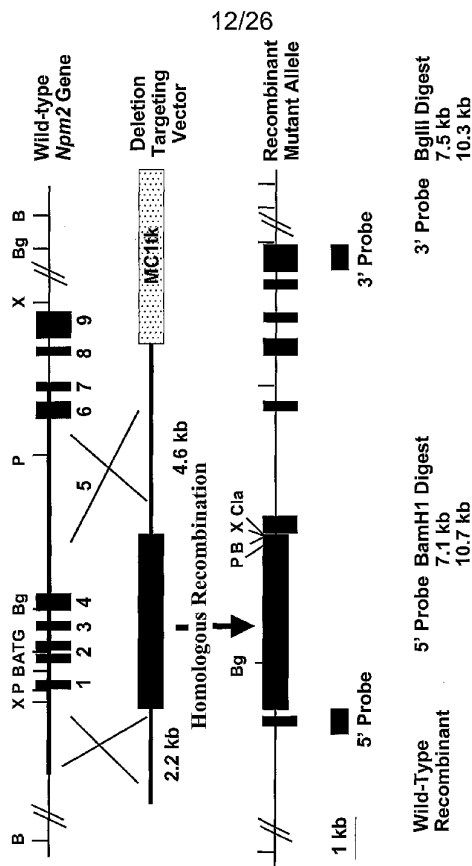


FIG. 10A

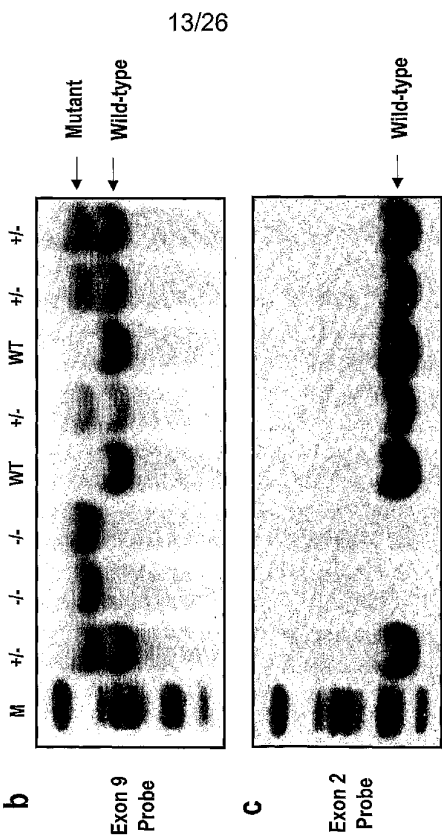


FIG. 10B

WO 02/088314

PCT/US02/13245

14/26

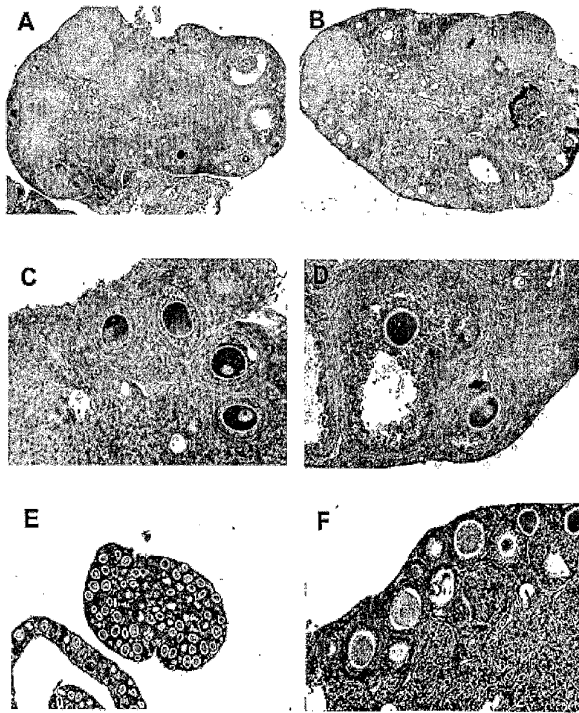


FIG. 20

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/088314

PCT/US02/13245

15/26

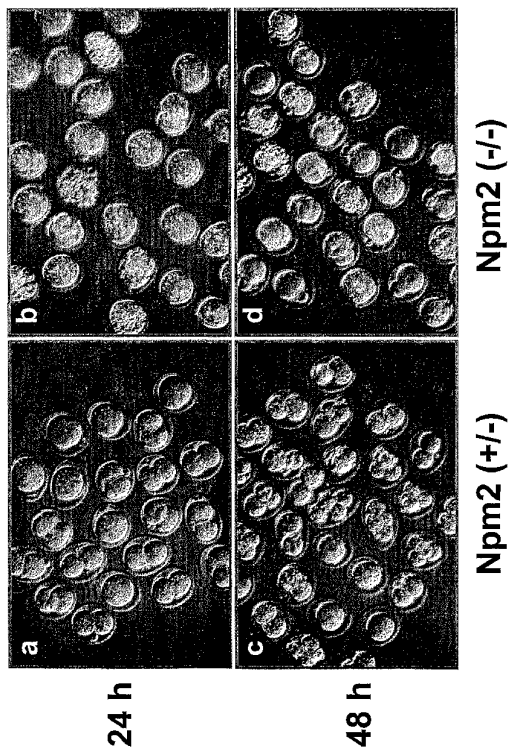


FIG. 12

WO 02/088314

PCT/US02/13245

16/26

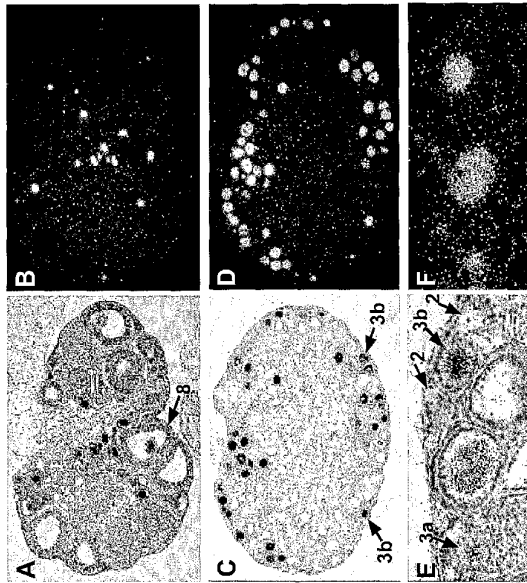


FIG. 13



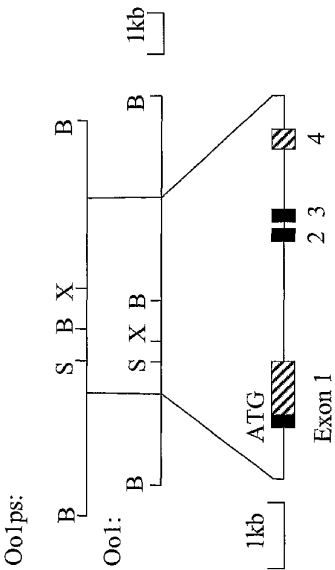


FIG. 14

[illegible]

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/088314

PCT/US02/13245

19/26

```
Oo1 gene AGATGTGCTGCCAGTCAGACTTGGCCAGTGGACCTTAAACGCCCCCATCGSCAAGACTTGTGTGGGA 1052
psOo1 gene AGATGTGCTGCCAGTCAGACTTGGCCAGTGTACCTTAGACGCCCCCATCGSCAAGACTTGTGTGGGA
Oo1 gene GATCCAGGACAAATGCTTGTCTGCGACAGCACCTTCAGCTTCAATACATGATTTAGTGAAGTACGA 1122
psOo1 gene GATCCAGGACAAATGCTTGTCTGCGACAGCACCTTCAGCTTCAATACATGATTTAGTGAAGTACGA
Oo1 gene AACGTTTCTGCTAGATGGGGCTAATGGAAATGGACAAAGTGAGCTTCTCCCCCTTTCCCTCTTCCCATTTTC 1192
psOo1 gene AACGTTTCTGCTAGATGGGGCTAATGGAAATGGACAAAGTGAGCTTCTCCCCCTTTCCCTCTTCCCATTTTC
Oo1 gene CAAATTCTTCATGACAGACAGTGTACTTTGGATATTAAGCCCTGTGATTAAGAGGTATTGCAACA 1257
psOo1 gene CAAATTCTTCATGACAGACAGTGTACTTTGGATATTAAGCCCTGTGATTAAGAGGTATTGCAACA
```

FIG. 15B

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/088314

PCT/US02/13245

20/26

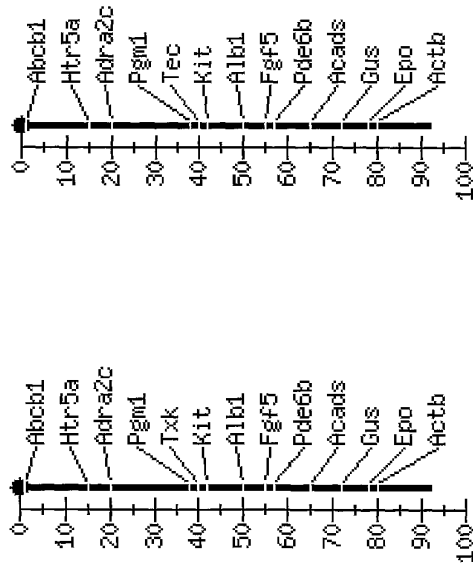
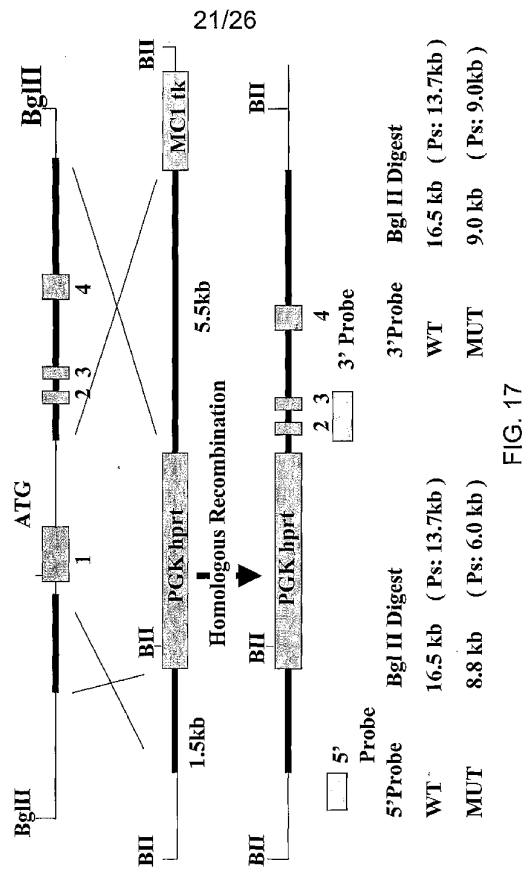


FIG. 16



WO 02/088314

PCT/US02/13245

22/26

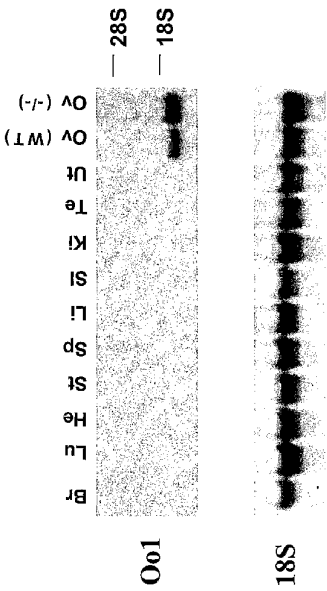


FIG. 18

WO 02/088314

PCT/US02/13245

23/26

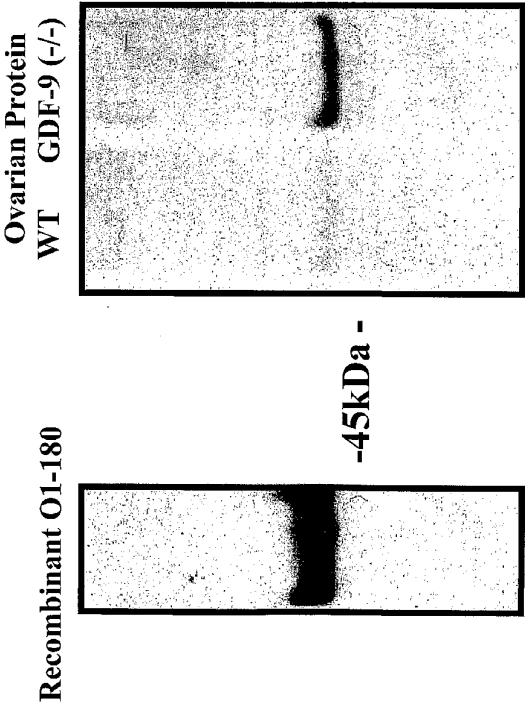


FIG. 19

WO 02/088314

PCT/US02/13245

24/26

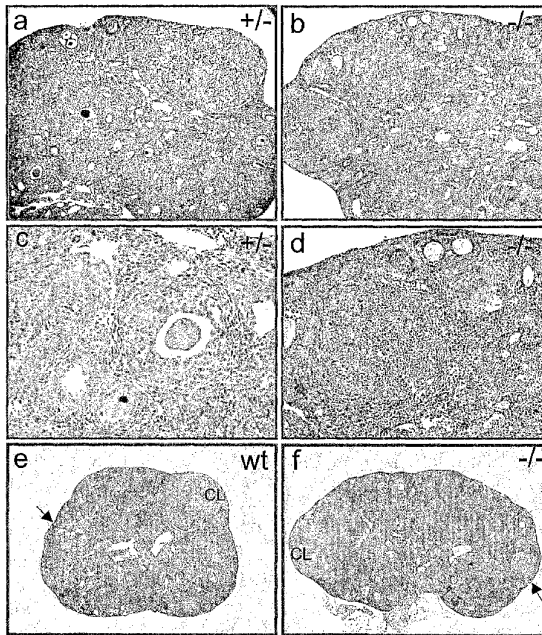


FIG. 11

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)



WO 02/088314

PCT/US02/13245

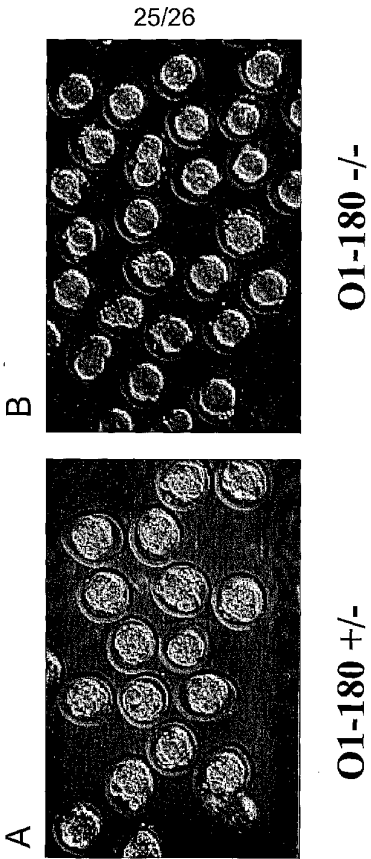


FIG. 21

WO 02/088314

PCT/US02/13245

26/26

C-end of human 01-180: FLEQKYGYH CKDCNIRWES AYVWCVOGTN  
C-end of mouse 01-180: FLEQKYGYH CKDCNIRWES AYVWCVOGTN  
C-end of human 01-180: KYVFKQFCRT CQKSYNPIRV EDITCQSCCK  
C-end of mouse 01-180: KYVFKQFCRY CEKSYNPIRV EDITCQSCCK  
C-end of human 01-180: TRCSCPVKLR HVDKRPFRQ DLGCRCKGKR  
C-end of mouse 01-180: TRCACPVRFH HVDKRPFRQ DLGCRCKDKR  
C-end of human 01-180: LSCDSTFSEK YII  
C-end of mouse 01-180: LSCDSTFSEK YII

FIG. 22

WO 02/088314

PCT/US02/13245

## SEQUENCE LISTING

<110> Wang, Pei  
Wu, Xuemei  
Matzuk, Martin M.  
Bai, Yuchen

<120> Ovary-Specific Genes and Proteins

<130> P01925W02

<140> PCT/US 02/13245  
<141> 2001-04-27

<150> US 09/844,864  
<151> 2001-04-27

<160> 23

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1  
<211> 1258  
<212> DNA  
<213> Mus musculus

<400> 1  
ggcggggcag cgcggggacg caccatgtt cccgggagc acgttcaccc cctgcccgca 60  
tccttatecg caggccacca aagccgggga tggctggagg ttccggagcca ggggctgccg 120  
aaccgcgcgc cctctcttcc tcccgcgcta cagacagctc atggcgcgcg agtacgtcga 180  
ccgccaccag cgggcacagc tcatggccct gctgtgcggg atgggtcccc ggtcgggtcag 240  
cagccgtgac gctgcggtgc aggtgaaccc gcgcgcgcgc gcctcggtgc agtgttcaact 300  
cgggcgcgcgc acgctgcagc ctgcagggtg ccgagccagc cccgacgccc gatcgggttc 360  
ctgtcaaccc cgtggccacg ccggcgccgg gagatccccg cgatcctggc agaccgtagc 420  
cccgttctcg tccgtgacct tctgtggcct ctctctctca ctggaggttg cgggagggcag 480  
gcagacaccc acgaaggag agggggagccc ggcatactcg gggacccggg aaccggagcc 540  
gagagagggtg gccgcgagga aagcgggtccc ccagccgcga agcgaggagg gcgatgttca 600  
ggctgcaggg caggccgggt gggagcagca gccaccaccg gaggaccgga acagtgtggc 660  
ggcgatgcag tctgagcctg ggagcgagga gccatgtcct gccgcagaga tggctcaggga 720  
ccccggtgat tcggatgccc ctgcgagcca ggctccccc caaagcacgg agcaggacaa 780  
ggagcgctcg cgtttccagt tcttagagca gaagtacggc tactatcaact gcaaggactg 840  
caaaatccgg tgggagagcg cctatgtgtg gtgtgtgcag ggcaccagta aggtgtactt 900  
caaacagttc tgccgagtgt gtgagaaatc ctacaacctc tacagagtgg aggacatcac 960  
ctgtcaaaagt tgtaaaagaa ctagatgtgc ctgcccgctc agacttcgdc acgtggaccc 1020

WO 02/088314

PCT/US02/13245

taaagcccc catcggaag acctgtgtgg gagatgcaag gacaaacgcc tgtcctgcga 1080  
 cagcaccttc agcttcaaat acatcattta gtgagagtcg aaacagtttc tgctagatgg 1140  
 ggctaattga atggacaagt gacgtttctc cctctctcac ctcttccctt tccaaattct 1200  
 tcatgacaga cagtattact tgagtataaa gcctgtgaat aaaaggtatt gcaaacaa 1258

<210> 2  
 <211> 361  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 2

Met Phe Pro Ala Ser Thr Phe His Pro Cys Pro His Pro Tyr Pro Gln  
 1 5 10 15

Ala Thr Lys Ala Gly Asp Gly Trp Arg Phe Gly Ala Arg Gly Cys Arg  
 20 25 30

Pro Ala Pro Pro Ser Phe Leu Pro Gly Tyr Arg Gln Leu Met Ala Ala  
 35 40 45

Glu Tyr Val Asp Ser His Gln Arg Ala Gln Leu Met Ala Leu Leu Ser  
 50 55 60

Arg Met Gly Pro Arg Ser Val Ser Ser Arg Asp Ala Ala Val Gln Val  
 65 70 75 80

Asn Pro Arg Arg Asp Ala Ser Val Gln Cys Ser Leu Gly Arg Arg Thr  
 85 90 95

Leu Gln Pro Ala Gly Cys Arg Ala Ser Pro Asp Ala Arg Ser Gly Ser  
 100 105 110

Cys Gln Pro Arg Gly His Ala Gly Ala Gly Arg Ser Pro Arg Ser Trp  
 115 120 125

Gln Thr Val Ala Pro Phe Ser Ser Val Thr Phe Cys Gly Leu Ser Ser  
 130 135 140

Ser Leu Glu Val Ala Gly Gly Arg Gln Thr Pro Thr Lys Gly Glu Gly  
 145 150 155 160

Ser Pro Ala Ser Ser Gly Thr Arg Glu Pro Glu Pro Arg Glu Val Ala  
 165 170 175

Ala Arg Lys Ala Val Pro Gln Pro Arg Ser Glu Glu Gly Asp Val Gln

WO 02/088314

PCT/US02/13245

180 185 190

Ala Ala Gly Gln Ala Gly Trp Glu Gln Gln Pro Pro Pro Glu Asp Arg  
195 200 205

Asn Ser Val Ala Ala Met Gln Ser Glu Pro Gly Ser Glu Glu Pro Cys  
210 215 220

Pro Ala Ala Glu Met Ala Gln Asp Pro Gly Asp Ser Asp Ala Pro Arg  
225 230 235 240

Asp Gln Ala Ser Pro Gln Ser Thr Glu Gln Asp Lys Glu Arg Leu Arg  
245 250 255

Phe Gln Phe Leu Glu Gln Lys Tyr Gly Tyr Tyr His Cys Lys Asp Cys  
260 265 270

Lys Ile Arg Trp Glu Ser Ala Tyr Val Trp Cys Val Gln Gly Thr Ser  
275 280 285

Lys Val Tyr Phe Lys Gln Phe Cys Arg Val Cys Glu Lys Ser Tyr Asn  
290 295 300

Pro Tyr Arg Val Glu Asp Ile Thr Cys Gln Ser Cys Lys Arg Thr Arg  
305 310 315 320

Cys Ala Cys Pro Val Arg Phe Arg His Val Asp Pro Lys Arg Pro His  
325 330 335

Arg Gln Asp Leu Cys Gly Arg Cys Lys Asp Lys Arg Leu Ser Cys Asp  
340 345 350

Ser Thr Phe Ser Phe Lys Tyr Ile Ile  
355 360

<210> 3  
<211> 1817  
<212> DNA  
<213> Mus musculus

<400> 3  
gtcacagctt tccoctgccc gaatatgggtg atctgtctcc attgtccaga tcaggatgat 60  
tctttagaag aagtcacaga ggaatgctat tccccacca ccotccagaa cctggcaatt 120  
cagagtctac tgagggatga ggccttgccc atttctgctc tcacggacct gcccagagt 180  
ctgttccag taatttttga ggaggccttc actgatggat atatagggat cttgaaggcc 240

WO 02/088314

PCT/US02/13245

```

atgataccctg tctggccctt cccataccctt tctttaggaa agcagataaa taattgcaac 300
ctggagactt tgaaggctat gcttgaggga ctgatatata tgcttgcaaa aaaggttcaa 360
accagtaggt gcaaaactcag agtaattaat tggagagaag atgacttgaa gatatgggct 420
ggatcccatt aaggtgaagg cttaccagat ttcaggacag agaagcagcc aattgagaac 480
agtgtggct gtgaggtgaa gaaagaattg aaggtgacga ctgaagtctt tcgcatgaag 540
ggcagacttg atgaatctac cactactctg ttgcagtggt cccagcagag aaaagattct 600
attcatctat tctgtagaaa gctactaatt gaaggcttaa ccaagcctc agtgatagaa 660
atcttcaaaa ctgtacacgc agactgtata caggagctta tctaagatg tatctgcata 720
gaagagtgtg cttttcttaa tccctacctg aaactgatga aaagtctttt cactctcaca 780
ctagatcaca tcataggtac cttcagtttg ggtgattctg aaaagcttga tgaggagaca 840
atattcagct tgattttcga acttcccaca ctccactgtc tccagaaact ctatgtaaat 900
gatgtccctt ttataaaaag caacctgaaa gaatacctca ggtgcctgaa aaagcccttg 960
gagacacttt gcatcagtaa ctgtgacctc tcacagtcag acttggttg cctgccctat 1020
tgcttgataa ttgtgaaact caaacatctg catattagtg atatatattt atgtgattta 1080
ctccttgagc ctcttggttt tctccttgag agagttggag ataccctgaa aacctggaa 1140
ttggattcat gttgtatagt ggaacttcag ttcagtgcct tgctgcctgc cctaagccaa 1200
tgtttctacc tcagagaggt caactttctat gataatgatg tttctctgcc tttcttgaaa 1260
acaaattcta caccacacag cctgctgag tcagctgata tatgagtgtt aacctgccc 1320
tctagagtgc tatgatgaca gtggtgtaat actaacacac agattagaaa gtttttgctc 1380
tgagcttctg gatatactga gagccaaaag acagctccat agtgtctcct ttcaaacac 1440
caaatgctct aaatgtggtg ggtgctacat ttatgatcgg cataccaat gttgcctgtt 1500
tgtggaacta ctataagctt gattgtgaaa ctgagaaata gaaacttagt attggggact 1560
gatgaaatcc taagtgaatg tccactgcta aatggagcat gaaaatgtca atcacctaaa 1620
agtctgagat acacaggaaa gtcaataact tctctgagc tggatgaatg atgttgcatc 1680
tgtagaaagt atcaagcaat tgtagtttga atgtgttaca atagaagcac cattttatga 1740
gactggccca atctgttgac tgcatacaat aaatctgttg acttattaaa tttttaaaaa 1800
aaaaaaaaa aaaaaaa 1817

<210> 4
<211> 426
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 4

```

WO 02/088314

PCT/US02/13245

Met Val Ile Cys Leu His Cys Pro Asp Gln Asp Asp Ser Leu Glu Glu  
 1 5 10 15  
 Val Thr Glu Glu Cys Tyr Ser Pro Pro Thr Leu Gln Asn Leu Ala Ile  
 20 25 30  
 Gln Ser Leu Leu Arg Asp Glu Ala Leu Ala Ile Ser Ala Leu Thr Asp  
 35 40 45  
 Leu Pro Gln Ser Leu Phe Pro Val Ile Phe Glu Glu Ala Phe Thr Asp  
 50 55 60  
 Gly Tyr Ile Gly Ile Leu Lys Ala Met Ile Pro Val Trp Pro Phe Pro  
 65 70 75 80  
 Tyr Leu Ser Leu Gly Lys Gln Ile Asn Asn Cys Asn Leu Glu Thr Leu  
 85 90 95  
 Lys Ala Met Leu Glu Gly Leu Asp Ile Leu Leu Ala Gln Lys Val Gln  
 100 105 110  
 Thr Ser Arg Cys Lys Leu Arg Val Ile Asn Trp Arg Glu Asp Asp Leu  
 115 120 125  
 Lys Ile Trp Ala Gly Ser His Glu Gly Glu Gly Leu Pro Asp Phe Arg  
 130 135 140  
 Thr Glu Lys Gln Pro Ile Glu Asn Ser Ala Gly Cys Glu Val Lys Lys  
 145 150 155 160  
 Glu Leu Lys Val Thr Thr Glu Val Leu Arg Met Lys Gly Arg Leu Asp  
 165 170 175  
 Glu Ser Thr Thr Tyr Leu Leu Gln Trp Ala Gln Gln Arg Lys Asp Ser  
 180 185 190  
 Ile His Leu Phe Cys Arg Lys Leu Leu Ile Glu Gly Leu Thr Lys Ala  
 195 200 205  
 Ser Val Ile Glu Ile Phe Lys Thr Val His Ala Asp Cys Ile Gln Glu  
 210 215 220  
 Leu Ile Leu Arg Cys Ile Cys Ile Glu Glu Leu Ala Phe Leu Asn Pro  
 225 230 235 240

WO 02/088314

PCT/US02/13245

Tyr Leu Lys Leu Met Lys Ser Leu Phe Thr Leu Thr Leu Asp His Ile  
245 250 255

Ile Gly Thr Phe Ser Leu Gly Asp Ser Glu Lys Leu Asp Glu Glu Thr  
260 265 270

Ile Phe Ser Leu Ile Ser Gln Leu Pro Thr Leu His Cys Leu Gln Lys  
275 280 285

Leu Tyr Val Asn Asp Val Pro Phe Ile Lys Gly Asn Leu Lys Glu Tyr  
290 295 300

Leu Arg Cys Leu Lys Lys Pro Leu Glu Thr Leu Cys Ile Ser Asn Cys  
305 310 315 320

Asp Leu Ser Gln Ser Asp Leu Asp Cys Leu Pro Tyr Cys Leu Asn Ile  
325 330 335

Cys Glu Leu Lys His Leu His Ile Ser Asp Ile Tyr Leu Cys Asp Leu  
340 345 350

Leu Leu Glu Pro Leu Gly Phe Leu Leu Glu Arg Val Gly Asp Thr Leu  
355 360 365

Lys Thr Leu Glu Leu Asp Ser Cys Cys Ile Val Asp Phe Gln Phe Ser  
370 375 380

Ala Leu Leu Pro Ala Leu Ser Gln Cys Ser His Leu Arg Glu Val Thr  
385 390 395 400

Phe Tyr Asp Asn Asp Val Ser Leu Pro Phe Leu Lys Thr Thr Ser Thr  
405 410 415

Pro His Ser Pro Ala Glu Ser Ala Asp Leu  
420 425

<210> 5  
<211> 1018  
<212> DNA  
<213> Mus musculus

<400> 5  
gccatattga ggacctgcag tagagggtgga acccatgact ggcagcgcaa acacagtgat 60  
aacagctgag ctccaagcaa ggaccagga ccttgctca ccacagacat aatctttccc 120  
cacaacacct ccaccaagcc gccctgtaaa tcgacatgag tcgccacagc accagcagcg 180  
tgaccgaaac cacagcaaaa aacatgctct ggggtagtga actcaatcag gaaaagcaga 240

6/36

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)



WO 02/088314

PCT/US02/13245

```

cttgccacct tagaggccaa ggcgagaaga aggcagctg taaactcttg ctccagcācga 300
tttgccctggg ggagaaagcc aaagaggagg tgaaccgtgt ggaagtcctc tcccaggaag 360
gcagaaaaac accaatcact attgctacgc tgaaggcatc agtcctgccc atgggtcactg 420
tgtcaggtag agagctttct cctccagtaa cttttcggt caggactggc tcaggacctg 480
tgttctcag tggcctggaa tggtatgaga cttcggacct gacctgggaa gatgacgagg 540
aagaggagga agaggaggag gaagaggatg aagatgagga tgcagatata tcgctagagg 600
agatacctgt caaacaagtc aaaaggggtg ctocccagaa gcagatgagc atagcaaaga 660
aaaagaaggt ggaanaagaa gaggatgaaa cagtagtgag gccagccct caggacaaga 720
gtccctggaa gaaggagaaa tctacacca gagcaagaa gccagtgaac aagaatgac 780
ctcatcttag catctttctg gtccaaggca ggtgtlccag cagctgtgtt ttggtgcagg 840
tgtccagccc caccaccta gtctgaatgt aataaggtgg tgtggctgta acctgtaac 900
ccagccctcc agtttcgga ggtttttggt gaagagcccc cagcaagttc gcctagggcc 960
acaataaaat ttgcatgac aggaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1018

```

<210> 6  
 <211> 207  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 6

```

Met Ser Arg His Ser Thr Ser Ser Val Thr Glu Thr Thr Ala Lys Asn
1          5          10          15

```

```

Met Leu Trp Gly Ser Glu Leu Asn Gln Glu Lys Gln Thr Cys Thr Phe
20          25          30

```

```

Arg Gly Gln Gly Glu Lys Lys Asp Ser Cys Lys Leu Leu Leu Ser Thr
35          40          45

```

```

Ile Cys Leu Gly Glu Lys Ala Lys Glu Glu Val Asn Arg Val Glu Val
50          55          60

```

```

Leu Ser Gln Glu Gly Arg Lys Pro Pro Ile Thr Ile Ala Thr Leu Lys
65          70          75          80

```

```

Ala Ser Val Leu Pro Met Val Thr Val Ser Gly Ile Glu Leu Ser Pro
85          90          95

```

```

Pro Val Thr Phe Arg Leu Arg Thr Gly Ser Gly Pro Val Phe Leu Ser
100         105         110

```

7/36

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/088314

PCT/US02/13245

Gly Leu Glu Cys Tyr Glu Thr Ser Asp Leu Thr Trp Glu Asp Asp Glu  
115 120 125

Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu Asp Glu Asp Ala Asp  
130 135 140

Ile Ser Leu Glu Glu Ile Pro Val Lys Gln Val Lys Arg Val Ala Pro  
145 150 155 160

Gln Lys Gln Met Ser Ile Ala Lys Lys Lys Lys Val Glu Lys Glu Glu  
165 170 175

Asp Glu Thr Val Val Arg Pro Ser Pro Gln Asp Lys Ser Pro Trp Lys  
180 185 190

Lys Glu Lys Ser Thr Pro Arg Ala Lys Lys Pro Val Thr Lys Lys  
195 200 205

<210> 7  
<211> 6970  
<212> DNA  
<213> Mus musculus  
  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(6970)  
<223> N equals unknown

<400> 7  
acagcagagg tgatgctcag aaatcaagtt ttaacagagg gccagggtgt tctagagtag 60  
gaggggattg cacacctccc caccacctcc tctttcccag gcttcttaac agcctgtgtg 120  
gggaagctga cccttagatg gagccctgaa gccatattga ggacctgcag tagaggtgga 180  
acctatgact ggcagcgcag taagcttgag caggnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 240  
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 300  
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 360  
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 420  
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 480  
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 540  
nnnnnnnnnn nnnnnnnnctt tgcattactc agaacacagt gataacagct gagctccaag 600  
caaggaccca ggaccttgcc tcaccacaga cataatcttt cccacaaca cctccaccac 660  
gccgccctgt aaatcgacat gactgcccac agcaccagca gcgtgaccga aaccacagca 720

WO 02/088314

PCT/US02/13245

```

aaaaaacatgc tctgggggtaa gggctaaggc tnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn 780
nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn 840
nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnngtctt cgtctgtccag 900
gtagtgaact caatcaggaa aagcagactt gcaccttttag aggccaatgc gagaagaagg 960
acagctgtaa actcttgctc agcacgggtg gtgtctccca annnnnnnnnn nnnnnnnnnnn 1020
nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn 1080
nnnnnnnnnnn nnnncatcac tttctcagat ctgcctgggg gagaaagcca aaggaggagt 1140
gaaccgtgtg gaagtctctt cccagggaag cagaaaacca ccaatcacta ttgctacgct 1200
gaaggcatca gtctcgccca tgggtgagtc tctctccnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn 1260
nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn 1320
nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn 1380
nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn 1440
nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn 1500
nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn 1560
nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn 1620
nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn 1680
nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn 1740
nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn 1800
nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn 1860
nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn 1920
nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn 1980
nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn 2040
nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn 2100
nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn 2160
nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn 2220
nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn 2280
nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn 2340
nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn 2400
nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn 2460
nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn 2520

```

**PCT/US02/13245**

[illegible]

**PCT/US02/13245**

ttcttcttcttctt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	4440
tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	4500
tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	4560
tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	4620
tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	4680
tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	4740
tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	4800
tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	4860
tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	4920
tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	4980
tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	5040
tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	5100
tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	5160
tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	5220
tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	5280
tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	5340
tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	5400
tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	5460
tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	tttttttttttttt	5520
ttccaggagac	ttcggacctgc	acctggggaag	atgcaggagga	agaggaggaaa	gaggaggagg	5580
aaggaggatga	agatgaggat	gcagatatat	cgtataggaga	gataacctgtc	aaacaagtca	5640
aaagggtggc	tccccagaag	cagatgatgca	tagcaaaagtt	gggggggaaaa	gaannnnnnn	5700
tttttttttttt	tttttttttttt	tttttttttttt	tttttttttttt	tttttttttttt	tttttttttttt	5760
tttttttttttt	tttttttttttt	tttttttttttt	tttttttttttt	tttttttttttt	tttttttttttt	5820
tttttttttttt	tttttttttttt	tttttttttttt	tttttttttttt	tttttttttttt	tttttttttttt	5880
gggtttttgtt	ccagaaaaag	aaggtgggaaa	aaagaaggaga	tgaaaacagta	gtcagggtaat	5940
tcatgcagttt	tttttttttttt	tttttttttttt	tttttttttttt	tttttttttttt	tttttttttttt	6000
tttttttttttt	tttttttttttt	tttttttttttt	tttttttttttt	tttttttttttt	tttttttttttt	6060
tttttttttttt	tttttttttttt	tttttttttttt	tttttttttttt	tttttttttttt	tttttttttttt	6120
tttttttttttt	tttttttttttt	tttttttttttt	tttttttttttt	tttttttttttt	tttttttttttt	6180

WO 02/088314

PCT/US02/13245

```

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 6240
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 6300
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 6360
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 6420
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn ctattccctt tccaggccca gccctcaggga 6480
caagagtcctc tggaaagaagg tggcaataa gaagnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 6540
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 6600
nnnnnnctct tatctgcaca ggagaaatct acaccocagag caaagaagcc agtgaccaag 6660
aaatgacctc atcttagcat ctctgcgtc caaggcaggga tgtccagcag ctgtgttctg 6720
gtgcaggtgt ccagcccccac caccctagtc tgaatgtaat aaggtggtgt ggctgtaacc 6780
ctgtaaccca gccctccagt ttcgggaggt ttttggtgaa gagcccccag caagttcgcc 6840
tagggccaca ataaaatttg catgateagg acctccctct gcccccctc cctggatgg 6900
gtctctctgc tgcctcgata gctcatgtgc ccagcagagg gcaaccacga gcaagaacc 6960
agcccatgt 6970

```

```

<210> 8
<211> 1207
<212> DNA
<213> Human

```

```

<400> 8
agggggcgcc agggggcctc ggcgggtcgg caattggcgg ggacagcttc tcacgaaagg 60
tcctggggcgg gcatcatcag cctcacctgg gaactggtta gaactacaaa ttccctcgcc 120
ccacaccaga ccgaacccaa gggcagctgt ggaagtggggc gcggcaatgc gcccttaac 180
agccctccag gcttcttagc ccgggcttgg acagccgctt tcggccaga ggggatgagg 240
ttgcgctgcg ctccgggagc gccgatggcg tgaactggcc gcgcgggagc agcgacactg 300
ccggccagc cgccttctct gcccgagacc atgaatctca gtagcgccag tagcacagg 360
aaaaggcagt gacgacogtg ctctggggct gcgagctcag tcaggagagg cggacttgga 420
ccttcagacc ccagctggag gggaagcaga gctgcaggct gttgcttcac acgatttct 480
tggggggagaa agccaaagag gagatgcac gcgtggagat cctgccccca gcaaacccag 540
aggacaagaa gatgcagcgg gtcaccattg cctcactcca ggccctcagtc ctcccatgg 600
tctccatggg aggagtgca ctttctccc cagttacttt ccagctccgg gctggctcag 660
gaocogtgtt cctcagtgcc caggaaactt atgaagcacc agacctaac tgggaggagg 720
aggaggaaga agaaggggag gaggagggaag aggaaggga agatgatgag gatgaggatg 780

```

WO 02/088314

PCT/US02/13245

cagatatatc tctggaggag caaagccctg tcaaacaaagt caaaggctg gtycccccaga 840  
 agcaggcgag cgtggctaag aaaaaaaagc tggaaaaaga agaagaggaa ataagagcca 900  
 gcgttagaga caagagccct gtgaaaaagg ccaaagccac agccagagcc aagaagccag 960  
 gattcaagaa atgaggagcc acgccttggg gggcacgggt caaagtgggc cttccctggg 1020  
 ctgtgctgca ggcacagggt gccctgtcc agccctcca cctgtgtctg aatgcaacag 1080  
 ggggtgttgc ggggcaacat gagagccct caccocccac tctccacttt caggaggccc 1140  
 ccagtgaaga gcccacctc ggggtcacia taaagttycc tggtcaggaa aaaaaaaaaa 1200  
 aaaaaaa 1207

<210> 9  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> Human

<400> 9

Met Asn Leu Ser Ser Ala Ser Ser Thr Glu Glu Lys Ala Val Thr Thr  
1 5 10 15

Val Leu Trp Gly Cys Glu Leu Ser Gln Glu Arg Arg Thr Trp Thr Phe  
20 25 30

Arg Pro Gln Leu Glu Gly Lys Gln Ser Cys Arg Leu Leu Leu His Thr  
35 40 45

Ile Cys Leu Gly Glu Lys Ala Lys Glu Glu Met His Arg Val Glu Ile  
50 55 60

Leu Pro Pro Ala Asn Gln Glu Asp Lys Lys Met Gln Pro Val Thr Ile  
65 70 75 80

Ala Ser Leu Gln Ala Ser Val Leu Pro Met Val Ser Met Val Gly Val  
85 90 95

Gln Leu Ser Pro Pro Val Thr Phe Gln Leu Arg Ala Gly Ser Gly Pro  
100 105 110

Val Phe Leu Ser Gly Gln Glu Arg Tyr Glu Ala Ser Asp Leu Thr Trp  
115 120 125

Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Gly Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu  
130 135 140

Asp Asp Glu Asp Glu Asp Ala Asp Ile Ser Leu Glu Glu Gln Ser Pro

WO 02/088314 PCT/US02/13245

145 150 155 160

Val Lys Gln Val Lys Arg Leu Val Pro Gln Lys Gln Ala Ser Val Ala  
165 170 175

Lys Lys Lys Lys Leu Glu Lys Glu Glu Glu Glu Ile Arg Ala Ser Val  
180 185 190

Arg Asp Lys Ser Pro Val Lys Lys Ala Lys Ala Thr Ala Arg Ala Lys  
195 200 205

Lys Pro Gly Phe Lys Lys  
210

<210> 10  
<211> 19951  
<212> DNA  
<213> Human

<400> 10  
ggcatcccca tatgatgggt actagcggct gggaagtggg ggtgggggga ggaatgaacag 60  
aggttgatta atgggtacaa acatactgtt tgatggaaat aagataagtt gaaataagaa 120  
ataagttgat agtacagtag ggtgactata gttaacaata atttatgtta tatttcaaaa 180  
tagotagaag agaagatttg aaatgtttcc aacacaaaga aatgataaat gtttagccgg 240  
gcccagtggc tcatgcctgt aatcccagca ctttgggagg cctaggcagg aggatcactg 300  
aggtcaggag ttgagacca acctggccaa catggtgaaa ccccatctct agtaaaaaata 360  
tgaaaattag ctgggcatgg tggtaagcac ctataaacc agctacttgg gaggtgagg 420  
caggagaatc gcttgaacat gggaggcaga ggttatagt agctgagatg gcaccaccgc 480  
actccagcct gggatgatgag agtgaaacgc catctccaaa aaaaaaaaaa aaaagaaaag 540  
aaataatggt gaaggtaccc cagttacctt gatttgotca ttacacattg tgtgcaagta 600  
taaaaatata atatgtaccc cataaatatg tacaattaat atgtatcagt ttaaaaagtt 660  
aatgacgatg gtaccaatat tatagctca tttagcagat gaggaactg aggcactgag 720  
ctatgaatta acacacctga aatcacagag cacagtccag acttgaaccc agactgtcca 780  
gttccagtgt ccagctccta ggtcatgacc tcagggtcat cccctccccc tgcctccatt 840  
tagccttcac tgtgaccccc agctgcagcc tgacatcagt gtgattatc acgggggtggg 900  
tagcctgggg ccactgaagg cgggtttgct ttgagcactg ctctccaatg aggctggaag 960  
ccctttgagg ggctgtogta ttaccgcgg gatgccagg tccgcacca ttggcggaaat 1020  
cacggtttgt tgagtgaatt cttgaacgtc tgtgcattggc atgcatgtgc ctgccatttg 1080



WO 02/088314

PCT/US02/13245

```

ctcatcttta ccacacactt ggctgcaatg gctgtcacct tcaataggcg ccttgccagg 1140
gacagagagc tcaggggacag ccaaggagac tggaaactgct cagctgggga tagggagcct 1200
agggggccct ggcaggcccc caagcctctc ctgggttctc ctggccaatt cacaggggag 1260
ctgacccacg cttccaggaa taaaagattc tgacctctcc gtggcaatga gccctgtcc 1320
caggggtgtg cgggagatcc ctggttatct gaggtgtctc cagggtatat ccgtgaaac 1380
ccacttcct cttcactgcc cactgagcct gggaccagct gctggtcaoy tgettgccc 1440
tgtagcgtcg ctgacgtgct tectcagttg tgetccccgc cccctgcccg ggcgcctcgc 1500
ctcccgctc acctccccc cccactgcc cgtgcggct ctcggcgagg agatctcacc 1560
gttctggaga cagggtctgc tgcctctcac ggtaggctgg aagaacgggc tgtctgggc 1620
ttaggaagg cccatgctgt ataaggcatg gggaaaggaa aggaagaaa gcaacgaaca 1680
agaaggagg cttccaaactg cagcttctcg ccggtgcag gcctcccttc ctaagctgag 1740
ctgaggtctc ctctccatgg gctggggagg gggcgccagg aggcctcggc gggctcgcaa 1800
ttggccggga cagcttctca cgaaggtcc tgggcccga tcatcagcct cactgggaa 1860
ctggttagaa ctacaaattc cctggcccc acccagaccg accccaagg cagctgtgga 1920
gtggggcgcg gcaatgcgcc ccttaacagc cctccaggtg attctgcgcg gcagaggagg 1980
aaagaaatgg agaagggaag gggagaggga ggcggtctt ttgcgaactaa ttggacacct 2040
gcccttcccc ttcccaggct tcttagcccg ggcctggaca gccgccttc gccacagagg 2100
gatgaggttg cgtgcgctc cgggagcgcc gatggcgtga ctggccccg gcggagcagc 2160
gacagtaagg ctgtgtgggg ggagctggga cctaagccgc gcgcacccc cttctctgc 2220
gtctggttga ggtgcacaga ggcttttgag tcaggcccaa cgcagccag gtgacctccc 2280
cgcggccttt caagcctgag ctcggtggac agctccctct ccgtgagtc ccgtgtctc 2340
gtacgcgcc ggtcgagccc cgggctgcgc acccgcctag gaggtgggtc ctgtctctcc 2400
aggagttgcc ggtgagccct tgaccgtggc aggtccctcc cagccgcgag cgaacctca 2460
gtacctgcc atgctgctg gtctctggca tctccagtc gagggtcagg gtcagggagc 2520
aaggcctcac ggcggcgccc tctttgcagc tgcccgccca gccgcctct ctgcccggag 2580
ccatgaatct cagtagcgcc agtagcacg aggaaggc agtgacgaac gtgctctggg 2640
gtgagtgagg actcaggctc cttccagag acacgcccc cctccggtgc gcggcagctt 2700
ggggcgcagg tgagccctc ctttgggaac gaatggagg cccacttcc ctcccttct 2760
cctccgcagg ctgcagctc agtcaggaga ggcggaactg gaccttcaga cccagctgg 2820
aggggaagca gagctcagg ctgttgcttc atacggtagg tgttccaaa agaggggagg 2880
aagatggtgt cggggaactt tctggtccca accgagggt atggatttct ccgtcggcc 2940

```

WO 02/088314

PCT/US02/13245

```

ctcagggtga tgaggggacct ctattttcaa ccccgctcag atttgcttgg gggagaaagc 3000
caaaaggagg atgcattgctg tggagatcct gccccagca aaccaggagg acaagaagat 3060
gcagcagggtc accattgctc caetccaggc ctcatctctc cccatggtgc gcattttcct 3120
gctggctgga agactgctgt cagcctcacc ctccaccttg ggtggggatg gacacacacg 3180
agggtgcatt caccctacag aaatgagcca tgctaggagg gtagcacagc ccatgcagaa 3240
agcgggggtc cagccagctc cacccttcc tagagctgtg tgaccttggg ccagttaagc 3300
tgtctgcata aattacaact taaaccaggg gtcccaact gccgggtcaa ggaccagaac 3360
tcgtctgtt aggaaccggg cagcacagca ggaggtagc agccagctag ccagcattac 3420
ccctgagccc tgcctccctg cagatcagag cggcattaga ttctcagagg agcatgaacc 3480
ctatgttaag ctgtgctgc gaggggtcta ggttgcatgc ttcttatgag aatcgaatgc 3540
ctgatctgag gtggagcagt ttcatcccaa aaccacccc cactccacc ccatccatgc 3600
aaaaattgtc ttccaggaaa ccatccctg gtccacaat gattggagac tgctgcttta 3660
aaccattcac tgctagtgc aggaacatgg tcgactaca tattggttgt gcattcagaa 3720
attctctagt ttctaataac ttaagtttct tatgcatata ataattgtga ataaggcag 3780
ttcttgctt ttttttttt ttttttgaga tggagtttca ctctgtcacc caggctggag 3840
tgcatgggtc caatctcagc tcactgaat ttctgctccc caggttcaag caattctagt 3900
gcctcagcct tcggagtagc tgggattaca ggtgtgcacc accatgcctg gctaattttt 3960
gtatttttag tagagacagg gtttcacaat gttgcccagg ctagtctcga actcctgacc 4020
tcagggtgatt cgcctgctt ggccctccga agtgctggga ttacaggcgt gactcaccac 4080
gcagggtctt ttttcttct ttctttctt taatcctact gcactggcta ggccctgcag 4140
tggaaatttg ggtgaacatg agatcagggtc tgacatcctt atttctctct tgttttttaa 4200
aaaagaagca tttggtaagt acattttgtc aggttaagga agtcccatc taaaacctc 4260
tgcttttaaa aaattgcttt gctttgaaat cactagaggg ggttaaattt taccaaatgc 4320
ttttctatto atatgattct aggttcttta gtccacgttg taaattgtat gaagagaata 4380
atatctgagt tcttttgcca tcttgggata aatactactg gtcattgtac aaattctaga 4440
tttgttttac tcatataattg agcccttttt ttacctgta tacatgtgag gttggcctat 4500
aagtgatagt atttaggtgt tcaggacatg ctagcctcat gcactgaggg tggagggttc 4560
tctctatto cctggaacag tgaatggaag actaggatca gctgtccttg gaggtttggg 4620
agccctctct gtcaaacctg cctcagactt tctgttcta tttacacata ctttgacagg 4680
gatctcatcc tttctgtgg ttttcaagac catctaaaca aatgaagaat caggaaactta 4740

```

WO 02/088314

PCT/US02/13245

```

ttctgtataa ctcaacctct cttagagctcc aagtcctata tccaactaaa tggctttgat 4800
agatattctaa taaatatccc aaatttaaca tgtctaaaac cacatattca atttttatct 4860
ctaattccacc ogcctccctc tcaacctgat ttctctcag aaaacagctg tttttccagt 4920
tagccaagac aaagctcttt tttttttttt ttccctcag atggagtttc actcttatca 4980
ccagggctgg agtgcaatgg tgcgctctcg gctcaactga acctccgcat cccatgttgg 5040
agcgattctc ccatctcagc ctcccaagta gctgggatta caggcatgtt ccactacgcc 5100
aggctaattt ttgtaatttt agtagagatg ggtttttgcc atgttggtca ggtgggtctc 5160
gaactcctga cctcaggtga tatacccgcc ttggcctccc aaagtgtctg atttacaggg 5220
atgagccacc acaaccagcc aaatctcttt ttttccaca ccatatctg atctaccagc 5280
agtcctgttg tctctgccc catottatac ccaatggac cacatctcat catcttccct 5340
gctacccttg gtacaggtga cagttgctg ttgctccatt ttaattgca agcctccac 5400
ctggtctacc taccatcaca tggctccctg tagtctattc cagggtaggg aaactagagg 5460
gcttgaatct aggtctgctc ctggttttgt aagtgtttt actgggaaca cagccacct 5520
cattggtttg taacctgtcc atggctgctt ttctcccta acagcagatt tgagtgtct 5580
ccatggagac catatggttt gcaaacctaa aatattacct tctggctctt aacagaaaat 5640
tctctggtct gtgctccaca cagctgccaa aaagattttt tttttttttt tttttttttt 5700
tgagacagaa tcttgctttg ataccagggc tggaaatgag tggcttaato tggctcact 5760
gcaacctcca cctccttagt agcggggaca acagggctc cccacctgc ccagctgatt 5820
tttttttttt ttttgaattt ttttagtag aggggtttt accatgttg ccaggtggt 5880
cttgaacttc tgacttcaag tgatccacct gctcagcct cccaaagtgc tgagattata 5940
ggcgtgagcc actatgccca gccaaaaaga tctttttaa cacaggttag atcatgtggc 6000
ttctctgcta gaatagttag gtcatggctc tctctcattt ggaataagag ccgagagtgt 6060
attatggcct gcttogaagc ctttgtgttc tggcctcagc aaactctctg tttcaggtgt 6120
gttttatgtc ttatgttcca ggtatgtate ttttacacag tatgtagcta gattttgttc 6180
tatctgcca gtatagtctg tattcatgtt gattgtgat gtaattggat ttgtggcatg 6240
tactttgtac cctactttc cttgtttttt tttttcttc tcttttct atattttatt 6300
agattaatta aagttccttt tcccttctc tactggtttg gaagttatag aatctcatc 6360
taattttttt actgtttatc ttttaatttt ttaacaatca tacattactc aaagtttaga 6420
attaatgttt tatgtcctcc cagacaatcc aaggagcttt tctgattctc ctttttttat 6480
ttttttatct tcgaaatgga gtctcacttt gtttccagg cttagagtga gtggtgcaat 6540
cttgaetcac tgcacctctc gcttccagg tgattcaagt gattctctg cctcagcctc 6600

```

WO 02/088314

PCT/US02/13245

ccaagtagct gggattacag gtatgcacca tcatgcccag ctaatttttg tatttttagt 6660  
 agagacaggg attcaccacg ttggccaggc tgggtcttgaa ctctgagct cagggtgatcc 6720  
 tctgccttg gctcccaaa gtgctggaat tataggtgtg agctaccgca cctggcctga 6780  
 ttctcatctt tttacttca atattattat caagtgttct agctccaact tgtcagccta 6840  
 ctcaacacta ctcatctact gtactattgt attttccagt taattcttat gtaggtttac 6900  
 ttgtttacc aattagtttg gttaccactg cttctagcac ccacttcttc cttcttgatc 6960  
 taatttctta tcttttttag caacatactt tagtaagcct gagaatagta aacttattca 7020  
 ggctttgtct ggaaatatca tgatttttgc ctcatctctt catgatgggt tggctgtgta 7080  
 tataattcta gatagagagt ttctctcagc ttggaagctg ttctattctg gttcccaatg 7140  
 ttgctgttga agtctcctcaat ctgtctgatt attccctttt tggagatgct ttctctctct 7200  
 ggcttatttt aagataatgt cttttgtttt tattttctat agttttacca tgatgtgttc 7260  
 aggtgtagat ttattttttt tgtctgttca ggaactagggt ttctagacat gaggatctat 7320  
 gtctttgatc aattctggaa aattatttgt tgtttttctt ttgaatttg actgtcttcc 7380  
 agtctcccta gtcccttttc caattagata tatgttgggc cttctcactc tgtcccccgt 7440  
 gttagctccc ccaatgtttc tttaaatctc tccctctctg ccttatactg ggtaattcct 7500  
 tcacagcatt attgatcata ctaattctgc ttctgtggtt tttttctgct ttttaatcat 7560  
 ttgatcaggt ttctttttat ttttgtttta aagacaaggt cttgtctgtt tgcctagggt 7620  
 ggagtgcagt ggcctgatca tggctcactg cagcctcaaa ctctgggct caagtgatcc 7680  
 tcccactcag cctcctaagt agctgggact acaggcatga gccaccatgc ccagctaattg 7740  
 ttattatttt tttttagag ctggagctct actatgttat ccaggctggt ttctaatttc 7800  
 tgaactcaag cactcctcc acctcagcct ctcaaagtgc tgggattata ggtgtgagcc 7860  
 acatgcacca tctcagctt tgggtgtttt atatctagaa agctgcattt ggttcttttt 7920  
 cttttcataa tgtctgttc ttatgattat gattcctact ttatattta cttgttttta 7980  
 aacatatata tatatatata tatgtacata tttctgtata tacatatttt agagacaaga 8040  
 tcttctctg tgcgccagtc tggagtgcac tgitgcaatc atagctcact gcagccttga 8100  
 actcctgagt tcaagagatc ttcgggcctc agcccccccg agtagcctgg gctacaggcg 8160  
 tgcaccaaca caccagctt tatctgatat ttttttagat cagtgttcta agttcttgggt 8220  
 cgggctagtc tgcagtoact tgatttcttt ctgttgactc tagctggatt gtttcttcta 8280  
 tgttttgtaa ttttatacgg tgagctcact tttagtttat tttgtttttt tccaaaagaa 8340  
 ttcgatgtgg cctgagtttg gggagtgctc caacagagtg gttctgtgtt tgcctctgcc 8400

WO 02/088314

PCT/US02/13245

```

atttacctca ggaatatcat aagcttggga tttctgtac atttcttggc ttggcagtac 8460
tcaactgagta aattcagaac ccataagtga gaggtacagc tatggggtat gggctctcac 8520
tggagacttc ttttatttcc attcatgctt tgttgtttag ttctttaaatt ggtggctagg 8580
gttttgattt ttgtttttca tttttgagga gaagagggct ggtttgggct tttaggtctc 8640
taatcctcaa cacttacctt gggcctctca ctaagggtat agcccttgag ggtcctaccc 8700
tcccoatggt ggtctcagct acaactctcc tcttgcctg agcccaaggc ctgtctctct 8760
gactgtgaag attttgttgt tgtctgttg tgttttttaa agacagtctt gttctgtcgc 8820
ccaggctggc acgcagtggc gcaatctcgg ctcaactgag cctccgcttc ctgggttcaa 8880
gcagttctcc tgcctcagcc cctgagtag ctgggattac aggtgtgcac catcacacct 8940
ggctaatttt tgtattttta gtagaacag ggtttcacca tgttgccag gctggtctca 9000
aactcctgac ctcaagttat ccgcctgctt tggcctccca aagtgtcttg attacaggca 9060
tgagccaccg tgcgtgctcg gctgtgtgt gagttttgaa gcaaaaagtc ctggtgtttt 9120
tcaggctcat ttccctcgg ttgcagcaca ccagctctg cactgcctg tcttcatttc 9180
ttttttctt ttttcattca tcaactatca gaaggcatcc tctctcatt ttttatgtac 9240
gaggattctt ctgtcttact gttcagccat gcagtagaaa cactgaatta catcctctct 9300
ggcaatttcta agtgtctctg gctgcagagt ttgttttcaa ttattacct ctgtctgaac 9360
ttagagttta gaagctgtaa gttattcact ctaagctca gtttctct ctgtaaaagta 9420
tcagtaacta catcatgggt ttctgttgag gattttaatga gataaagcag ataaaatgct 9480
tagcaggggt cctgacacgt ggcagaagct caaaacaata agctatcatt gtcattcgag 9540
aaaatttggg aagtttgaa aagtataaat acaataaata ccttactatc gactgacaat 9600
tatggttagc actttaatat attttaaac ttatttotta tgtatatcca tacattatac 9660
ataagacaaa agtagtactg tagaggctct tgtcatttat aagtgtgatg attggggttt 9720
cacgctcgtg tglagggtg gctccccaca aacctggtta cgagttggca catcacctgt 9780
ctgatgtgaa gaaagcaagc agcactgtac ataaaatcat gcactctgct tctcgtttga 9840
tcggtgtctc agtctgocca agttgctata acaaaatacc acagactgga gggctttagc 9900
aacagacgtt ttctcacact tctggaggct ttgaggtctg agatcagggg gcgggcatgg 9960
ttgggttctg gtaagggtcc tctccctgag ttgcagacgg cagccttctt gctatgtgtt 10020
cacgtgtggg gcaggagagt ggagagaaa agagttagtt ctctagtgtc tctttttgta 10080
aaggtagtag ttctatcatg agggctctgc cctcatgacc ccaaacctaa tgacctccca 10140
aggcctgcat ttctaaatac tatcacactg gaggataggc cttcaacata ggaatttggg 10200
ggatgggggg aatggccata atttagccca tactaatcag attcctctat ctgacggctg 10260

```

WO 02/088314

PCT/US02/13245

cccttcagct tggaaagccca tctgtgagct tagcaagaat gggattacca ggttcaaatt 10320  
 cttggacaga atccacccca gcaggggctg agtagtgtgt agggtttggg gagggaaatc 10330  
 aactcagtat ttctgcctga ggcaggtccc cgaagggtgc caggccataag tggccctgtc 10440  
 ttctctgctt cctcccccgt caggtctcca tggtaggagt gcagctttct ccccagtta 10500  
 ctttcagct cggggctggc tcaggaccgc tgttcctcag tggccaggaa ogttatggta 10560  
 agtcagagcc tgcgatcagg aaggtccgtt agtacogtgc taggcagggg ctccgggacat 10620  
 actagctaact caaacactgg agggattctt gaatgttggg agaaaaatccc caaaggcaac 10680  
 atgacagcca gcagcctgga ctggaaggca agggcgctgg tccctgttct tcttctttac 10740  
 ctgccatgac ctctgtaggg tgcagccctt cacttgtaaa cttcaaagag cagttgtgaa 10800  
 gaataaatgg gatattcagg aaaagcactc agcgtatata ccagcactag ggaaccactg 10860  
 ttccaggatgt ggcgtctgca gtgatgcaga coatagcaac gcagaccata gcaacgcaga 10920  
 ccatagcaac ggcgcgatgt gctgaactct tcaaggctcc ttcaactgco cctcttttct 10980  
 gtatgattat gcctcattca tcagggtact ctccctgtaa aaagccttgg caggtccccc 11040  
 ttctcttagg ataaggtttc aattcttttag ctatttgttt tagattcttt cccctcttcc 11100  
 tcctcttctt cccctactct gcctaccttt agccttggcc ccagcccttg ccaatatgaa 11160  
 tccccctctt acccagccag agccacttcc cctgccctct ttctaccacc ccagccctct 11220  
 gcagggtctt cctagacccc ctaccctacc ctggccctcca ctgttgggag ggcagaaaag 11280  
 ggtgcccccc tgtacagggt gcaggcaggt aaccactgtc aactccaggc taggattctt 11340  
 ccagggcagt gcttggaaga acacggatca cagaatggga ggtgggcatt gattctgtag 11400  
 ctctgaagct gtgcccctgc atcctttccc atgctattac agaagcatca gacctaacct 11460  
 gggaggagga ggaagaaag aaggggagga ggaggaagag gaagaggag atgatgagga 11520  
 tgaggatgca gatatacttc tggaggagca aagccctgtc aaacaagtca aaaggctggt 11580  
 gcccagaag caggcagagc tggctaaggt gggggaagga gcgtggctgt ttggaaggaa 11640  
 gtggtacccc tacagaagca cttaagaggg gtgggcccac gggagcctgg gccagcctcc 11700  
 cagaatgagt gtacaggatg ggcacaggcc acctcagcta gttctggcca ggagctcagc 11760  
 agggaccttg tggacttttg gaatctgttg tggctctgga ctttgtctga actctcataa 11820  
 tacactgttt ttgtgttccc agaaaaaaa gctggaaaaa gaagaagag aaataaggta 11880  
 actctttcta cctattaaat tagccaaagt ctccagctga gatatacagt gttagaagaa 11940  
 atactgtgct gttgggatgt acgtgtacaa atgtacacac ggtgtgtcta cctgcactcg 12000  
 caggcactgt ggtatggaag tgctgaaggg tggcatcacc tttctggaag agcattacaa 12060

WO 02/088314

PCT/US02/13245

cgtttcttctc ttgggatctc attccagtga aggcattccc ttccacagaa ttccatccaa 12120  
 atttcagggg aaattacctg cactaagatg cttctcacgg ccaggcttgg tggcccacgc 12180  
 ctgtaatccc agcactttgg gaggctaagg caggcagatc acttgaggtc aggagctcga 12240  
 gactagcctg gtaaacatga tgaacccttg tctctactaa aaacacaaaa attaacccag 12300  
 cctgggtggc ttcttctaatt ccagctactc caggaggctg aggcattgaga attgcttgag 12360  
 cccggggaaa agttgcagtg agccgagatc gtgcactgc gctccagcct ggatgacaga 12420  
 gcgagactca gctgaaaaa acaaaatctt aaaaagacgc ttatggcatt attcgaatag 12480  
 tgaaaaaatg gaagcattct aatgtctac caatataaca attcactaag ctacatccct 12540  
 cttctcaatg gaattattca taatgcttat gaagaatata gcaacctgga aagtatgtgt 12600  
 atagtttttg ttgttttgtt taatgagaca gggttttgct ctgccaccca ggctggagtg 12660  
 tgatggcaca atcatggctc actgcagcct tagcttccct ggctcaagca atctcccac 12720  
 ctacagcttc caagtagcta ggaataggg cactgtccac tatgcatggc taacttttaa 12780  
 gttttgtgta gagacagggt cttctctatg tgcccaggct gatctcaaac tcttgacctc 12840  
 aagcaatcct cctgctcag cctcccaag cactggaatt acaagtgtga gctctgtcac 12900  
 ctgataagaa tattgatagt tcatacagca ggaataaag tcaattttat tttatttcac 12960  
 atatttttaa aaagagtttg accaggccgg gtacgggtgc tcaagcctgt aatccacga 13020  
 ctttgggaag ccaagggtgg aggatcactt gaggtcagga gttcaagacc agccttgcca 13080  
 acatagcaaa accctgtctc tactaaaata caaaattcag ctgggcgttg tggcatgtgc 13140  
 ctgtaatccc agctactcgg gaggtcagg caggagaatc acttagacco ggaatgcga 13200  
 ggatgcagtg aaccaagatc acaccactgc acaccagcct gggcaacaga gcaagactcc 13260  
 atctcaaaa aaaaaaaaa agtttgacca agaaaaaat aataccctg aaagaaaaa 13320  
 caccaaaatg tttagtgtgg gcagtaaaga aaactataag taatgtattt tctgtctat 13380  
 ttgtatattt ttgtacaaaa tggtaatat tttataatga aaaagacatt tgtgggcca 13440  
 gtgtggtggt gcacacctgc agtccagct tctcaggagg ctgaggcagg aggatcactc 13500  
 gagccacgga ggtcgaggct gcagttagct gtgatatgt cactgcactc cagcctgggc 13560  
 aacagaacca gactccatct caaaaacaaa ccaaaaacaa agacatttgt gataactaaa 13620  
 tgaagatgga agcctaagga aaacacatat gcgtatgcat gcacacgac acacatccct 13680  
 ttgtttaaag agtccgagt gtcccagga ggagcagcca ggcttgctt ccagggtggg 13740  
 cactgggagg gccacgcgc tgggtctggag ctgagctctc tccctgaccc caatcccact 13800  
 cctgctccg tccacccctgt tgcagagcca gcgttagaga caagagccct gtgaaaaagg 13860  
 tgagtaggac cagagggtct tggcccttgg gacaggcgag tattctcttg agggggctgc 13920

WO 02/088314

PCT/US02/13245

ctgggtatgga gaagggaacg ggacccctgga gccctgcctt ccccccacag gccaaagcca 13980  
 cagccagagc caagaagcca ggattcaaga aatgaggagc cagcccttgg ggggcaaggc 14040  
 gcaaagtggg ccttccctgg gctgtgctgc aggcacaggg tgccctgtc cagccctcc 14100  
 acctgtgtct gaatgcaaca ggggtgttgc gggggcaaca tgagagccc tcaccccca 14160  
 ctctccactt tcaggaggcc ccagtgag agccccaact cggggtcaca ataaagttgc 14220  
 ctgggtcaggc ctttctctct cttccctgga gccagcctcc ttgtccgctg caccagccc 14280  
 agtgcccgcc agagggcagc cttgaaccgg tgcaccggg cctgagggtc atacctgcct 14340  
 ccttcgaccc agcccccggg gcttgagcct cctgtgtccc tggctctcgg ccccccaat 14400  
 tctcccccag tggcgaggga agagcctaga gtctgccttc tgctgagctg tgtgtcaggc 14460  
 ggatttccag cctgcaccct cctctggggc agagctaggt ttataggcac ccaagggcta 14520  
 cggctgtctc agctaccaga aggggcctcg ccttaggggg ccagcccca gggctctctc 14580  
 ctgaacttat tctgtcagg cagctactgt gtgcagagca tctataggga actcagggac 14640  
 atccgctctc cctgcttgtc tccgttaggg gccagctcat cttataggga cctcccat 14700  
 gtgaagatct gtgtcaggca ggagccagag gcccgccct tcaaaaaac cttttaggtg 14760  
 gactagacag ggtgagcttt acagaggcgc caagccccc atgctatcga gtaggcctca 14820  
 gtcaagcata gggcgaggc caagagagga ctggaaaatg ggggtgggga cccccccct 14880  
 ctccctgggt tgccaggggg actctggagg gctgttcacc tgtgggtgac cctggcgagc 14940  
 ttctagaac agggcgacac acagatgagc cctacactct gggttatcca tgcagcgcct 15000  
 ctgctggctt cctccgccc ctccccagca cctctgggg tcaggccga agtgaaccag 15060  
 tggggagctg gtcctgctgt cctgcttagt acccccagg atggggccca ggaggtcgga 15120  
 gctctttgaa cactgccta ggaagtcaa caaccaggct ggggcctct gtccagctat 15180  
 agcttctttt gagaccagag acagaggtag cagagggcag ggttgtatto attttttttt 15240  
 taatttttat tttttttaga gacagggtct cactctgtca ccaggctgg agggcagtg 15300  
 cacagtctta gctcaggca gccctgacct cctggaacta agcaactct caccctcac 15360  
 ctcccaaagt gctggaacta caggcacgag cccacacac aaaaacaatt ttaaaatttt 15420  
 ttgtagagat ggggggtctt gtttaagttgc ccaggccagt ctccaactcc tgggctcaag 15480  
 agatcctcct gctcagcct cccaaatgc tgggattaca gacgtcagcc actgcaacca 15540  
 ccagggtgg cgttctccct gcatgtttcc tacaccatg agacagatgt ggggtcgtgc 15600  
 ctgcccctca acagacaagc cactaacttt aggtcaccca gagtcccacc ctccaacaaa 15660  
 gggacaacc actaacttca ggtcaccag agagtgcaca gggggaactgc tccatgtgag 15720



WO 02/088314

PCT/US02/13245

cagctggtgc tttttgaact tggtttcacg tacagtgaac cggtgtaacc caattcctca 15780  
 ccttcaagtc acttacagtc tagtggaac aaaacccaac acaatttcag ttactgtctg 15840  
 gtgctttgaa gggagtggaa caggtgaact tgaggggcag gaggaagcag tttggtgaga 15900  
 aggtctcctg gaggagggca cggacaagaa gggctcaatg ggcttcatta ggagctggca 15960  
 gaggaagctc ctgggaacag gaacagagca tgcnaagggt ccgaggcaga gccccacttg 16020  
 aagggggatc ggctgcaagc acagcttcta atacccaaga cccactcctt caaccctcat 16080  
 aaccgtgctt taaggggatt gtgactggct ccattttctt ctctttttaa tttttttttt 16140  
 agatactggg tcacactctg tcagccaggt tggagtgtag tggcacgacg atggtctact 16200  
 gcagctcga actctgggct ccgctatcc tctgtctca gccccctcaa gtagctggga 16260  
 ctacaggcat gcaccactat accagctca ttttttttta acatttttgt agagatgggg 16320  
 atctcactat gtggccaggt ctagtctcaa actcctgacc tcacactatc cttctatcgg 16380  
 cctcccaag tgctgggatt acaggtgtga gccaccaac ctggccagc cccatttccc 16440  
 agatgagga agtggtggac agagaggtta gacaagttgc cccaagtgga ccggctggc 16500  
 agaggagcca gggagtccca cccagagcc ctggattttg accactctgc tgatgggagg 16560  
 gaggcacgag ccgtgcaaca gtttatgaag tcgtgttaac tgagagcagg agttagaagt 16620  
 cagtcaacca tgtaatggga gtctcaagg gacagctagg cgtttctaca gccaaagcga 16680  
 tatttgcccc caagcaaacg aaggcgcgca acagataaac cagtgtcac ttgattttga 16740  
 ttgcaagca ggcagtagga aataaattgc aaaggtggag gccgcatgca gtgtctcatg 16800  
 cctataatcc cagcaatttg ggaggccaag gtgggcagat caottgaggt cgggagtttg 16860  
 agaccagcct gaccaaacag gagaaccccc gtctctacta aaaatacaaa attagctggg 16920  
 tgtggtggcg ggcacctgta atcccagcta cttgggaggc taaggcatga gaatcatttg 16980  
 aaccagga gacagaggtg cgggtgagctg agatcgcgcc attgcactcc agoctgaaca 17040  
 acaagaatga aactccgtct caaaaaagaa aaatttgcaa aggtgaggggt ccactcctcat 17100  
 tgcaggggtg ccctttgccc tctgcccctt gcccttcccc tgccccact cttctgtttt 17160  
 tcagcaggaa gaggggtggc tgggctcaag cagggtggtg caagtggctg acctgcaggt 17220  
 gggctctgtg tttgcaacag ctgggctgtt aggagagga ggcgtgagac gaacccagct 17280  
 ggggggtgtt gaacttgga ctatggggtg aggattaac acagcagccc aggtacttc 17340  
 tcagttccct tateacctcc tgaacccac ccccccagca atgaatgtta ataaaccca 17400  
 cccttcttcc ctccccctt cccagagctc actccagta agggagagag tctgacagtt 17460  
 taggtcaact gaggttaag cacaanaagg gccctgccc ccattcttgt ggcacttgat 17520  
 gcgtttctgt gagtccttta tctcagctga cgtggatggc ggtggttttg acagtatccc 17580

WO 02/088314

PCT/US02/13245

tgctggtagc catttccttt ttataaactg ggaccctgaa accagagaag tgaaggagct 17640  
 tgccacaggt cacacagcgt ataaggacca gggcaagggt gcggggataa aatcaagggt 17700  
 tccatgctgc cccccactt gggggccacc actggcttcc ccatggggtt aaaggagcaa 17760  
 accaagttag aaggccaggc ctgcagggtc ccaacaggaa gggacaaggc gccacagctg 17820  
 tcttgccgtg gacacaggcc atccagccat gccacagctt aacccctgg ctaagccccc 17880  
 aggcocagct tgactgctgg catctgttac catggagacc caggctggcc tgagggtctg 17940  
 gccagtgtg gcaggccctg tcccatgga tagaaacagg tgcctgggct caggagcctt 18000  
 gagtggctcc cactgtcccc atggccagt agtcccgaca gcataaattg gaacogttac 18060  
 ccacctttcg cccccagct gacacctcca ccaacccaag gcctgagctg tccccccac 18120  
 gtgtctgtgc tctctttaat gcctgcctg ggggtgggga gtggtgagga tgtggtgtg 18180  
 aggttgaagg ttcttcaggg aatgagccag agctgccaga agaggcagag tgaaccacg 18240  
 actgcagatg atgggaagaa cggggaacag aagtgcctg aaggatccgc agggggaaag 18300  
 cagagaggtg ggcacggcgg cactgtgtac cttgtccac ccatgccaco agctagctgt 18360  
 gaggcctttg gcagctccct tgccctctct ggctctcacc caaggaaatga ggaagtggga 18420  
 acaaatgatg aatccctaag accccttcta ggtttgacat tctttgagtt gcattccaaa 18480  
 accctggact ccccaggta agcaaggcca gggcttgccc catctcccc acacaagctc 18540  
 aggcagcacc cactcctggg ctgggttccc gaggaagagc ctgcggagag gacaccccg 18600  
 agctgcctgc actggtcagt gcctgggggc aggggtggca gaccactttg tggattgatg 18660  
 gagctcaggc aggtgagaag ggaccacag gtgagagttt cgcctccctg gtcctctctt 18720  
 taggtaaata aatccacatc cgcacattcc ccttcccttc ccacccctggg ggcgctgaga 18780  
 actccaggga gccacagct gaggcctgag ctctgcttgc tcacactggg tcttccctca 18840  
 gagaccccca agccctccta tcttctgcag tcacogtcat ccacttttct gtagggaggg 18900  
 aacagcatg agctctctgt tcaccggtct ccaggacctc ggattccacc tttaattcgt 18960  
 aaaaaccagg aaggcttctg tatccctaca atgaagcagg ttgggggctg gatctgcagg 19020  
 gtggcaactc aatccatgca gaacagaaga agcatggact ttccattctt ggcatttcca 19080  
 ttactagct gggccattct gagcaacta cctcccaatg tgctcagtt tctcatctg 19140  
 caaanaggc tagtcgtgg cattgtaccg agcagtatga gaccggaggt catgggaaga 19200  
 ggcgtgtagg cacttcaccc caggcagctg ctccaggaca tgggacacag ggaaggagct 19260  
 ccgagctgct cctagctcag agaggctcta gggacaggca ctgggaaggaa ggggatgcag 19320  
 aatgggtgag ggagctgggt ctcaagaacac agacatcttg aagtctgcta tgtctgatt 19380

WO 02/088314

PCT/US02/13245

tcacacttga cccccaaca ccttgaggca ttactgtcct cttttctcag atggaactac 19440  
 agaggcccaa ggaagagggt cttaggccag gacaccagc tcttctcaa gtgtctgtct 19500  
 caggctagct ttgcaactc tccattggga ttcttctcag atctccatct gtacctgcca 19560  
 accacacctc gaccccaac ctgttgccc cagtatttc tgcgatcag gacagcctta 19620  
 accctcctt cccgggcaat cagctgtcc aagccaagc caccctgcc cctggagggt 19680  
 aggcggctcc ttttaaggct gcttctggga atttccactc cagagccaga accagagacc 19740  
 ccagccccc ttgacacctg cggctcacc ttggggaggt gggggccag acctgagtgc 19800  
 aggagacgca gacctggaag ggctccctc cctgacctg ccacacatcg agtttgtctg 19860  
 cgtcagttt ggccagtctg tgagggtcag gaatagaca ggagacagca gggccacctc 19920  
 ctccagaagg cccccaaccg tccatccctg c 19951

<210> 11  
 <211> 6873  
 <212> DNA  
 <213> mus musculus

<400> 11  
 ggatccctgt tgcagtcata ccttatggga aaagagcaac ttacctatct taaggagatt 60  
 gggggaattt agatatttgt gcaccccttt tcaactgaat gagaacaatg taccagatcg 120  
 tcaacagtgc acatttgacc cggccagtag caacatacct aaactacct caccattgta 180  
 aaacacctta agaattcaca gaaacttaca gtttttcaga gacaaatcaa ggagcagagt 240  
 tacagaatta aaacaattc atcatacctt agaattttct ctaatcgaat gagttgataa 300  
 ttgtttccat actcttagcc atctttggag ctatactttg aaggtaaaa atatctaga 360  
 ctaagttagt ttcatgtga agtgctagca gcctttgctt tctggtgtga aataagaact 420  
 aatttcaagt agaaagcaca gagttcagga gagatgaaga ctatgttgcc caggctagtc 480  
 ctcagcccat aactgggttc ttggggtaaa ttctagctgc tccattggaa ataagcaaga 540  
 cagtgaatta agcacacag aagagtacta aacgttgctt ggccaaggcc gagaggctga 600  
 gggctctgct agtaacggtt acccttccct gatctctggt ttatcgtttt gaagaccttt 660  
 tcagaaggag tagtctgtct gtatgtcctt ccatcccaag caagtgaaga gccagagga 720  
 gccactggat atcaagctag gtctccaaag agttatgtct aaggagcttc aggccttgtt 780  
 tgcaggttta gaatggatgt agcttgtcca gatgcctcct cagtgatgtt gttgttgata 840  
 ggttgcccat gtgtttcttt tcttaccagg ttccctgtg gtctctgctt gtgacctgg 900  
 tggttctttt cataatgact ggcacatgc tgggacctga actgctggca agcattccca 960  
 caactgttta cgtggctgcc atttttatgc ctctgggggc taagcctcgg gttatggctt 1020

WO 02/088314

PCT/US02/13245

```

agctaccctc ttcacctcog cccaactgca agaggactgt gtgtctggaa acaggaagtc 1080
agaacgtgca gcttctgcac tgcgattcct aaacttcccg cctcgcttta taggtagcat 1140
gtacatgttc ccttctgctc tacgccttct tccagtctgc cgaggcaggg gtcttctgtg 1200
tgatctacaa aatgtacgga agtgagatac tgcacaagcg agaggcccta gacgaagacg 1260
aagacaccga tatttcttat aagaaactga aagaagagga aatggcagac acctctctatg 1320
gcacogtggg gacgcattgac ttagtgatga tggagaccac ccagaccgco cctgtactga 1380
ggagatacac gggagctgaa acatcacttc ctatttgtga ccattbgtag cagataggtg 1440
tcgcctccgg gataaagatg ggttgacatt tctgttaaca gatttgctct tcccactgta 1500
atgtagtatc tcagtattac ccattgtgtt ttctaactca acagagtgtc ccaatattgc 1560
ttacacctgg atcagctaaa gtgcgcgctc ctctgcttaa gtagtgtgct gtttgtttgt 1620
ttgttttttg tttgttttg tttttttcca tttccaccag cattgtctaca gataggaaat 1680
ggggttgaaa atgtttgtaa aacagaaaca tgggtttgtt caacttacia acaaccgatt 1740
ctgttcaggg cgagcctgta ttgagaagag tccaaaacgg gtcaaaaagg gttgaacga 1800
caggatagca ttgcctctgc aagccagaga aaaccgtatt aatgtgtgtg actacttgat 1860
ctagtatcta ttgttaattg ccatacaact tgtgcagggg tgaagagcat ttttcccat 1920
atgtttcctg tatgtgtata aacgcctctc agctccattt atcgtctgaa ggaatgattt 1980
acttaggaaa atgcgtagac ctccactcag ggagagaaaa tgggccactt tgttcatcg 2040
tgggaaaggg ctgtggctac aggcctttct tccggaagg cctgtggctg gacactgtcc 2100
cactgtcttg gttagctgga gctgtgatct gagacaacct aagaggttca gagcagtctc 2160
ctaaccttgg tattttgctc cctaatacaga cacactggcc tcccttgtct tcttcatgac 2220
agacatctgg agctacagac atggggggccc acctggctcg gctaactctg gtgatgatcc 2280
tggggttgaa ttctcatctc atctagtctc cctacaaatc cttgtctggt ctagcaagga 2340
aagctctttt tctgcattca cgaggagtg ggggtggggg tgcctctta accagtgtgg 2400
ggaagggttt gctcctcatg gcaacagcag gtggtagggc tttttctacc agtgcgcggc 2460
cgctatttta acgcagcgtg gagggcagct gggctgcgct gatggctgcc tgggcgggcg 2520
aggcgggga cgcacccatg ttcccgcgca gcacgttcca cccctgcctg catccttacc 2580
cgcaggccac caaagcggg gatggctgga ggttcggagc caggggctgc gcacccgcgc 2640
ccccctctt cctcccggc tacagacagc tcatggccgc ggagtacgtc gacagccacc 2700
agcgggcaca gctcatggcc ctgctgtcgc ggaatgggtc ccggtcggtc agcagccgtg 2760
acgctgcctg gcagggtgaa ccgcgcgcgc acgcctcggg gcagtgttca ctcgggcgcc 2820
gcacgtgca gctgcaggg tgcgcagcca gccccgagc ccgacgggt tctgtcaac 2880

```

WO 02/088314

PCT/US02/13245

ccgcgtggcca cgcgcggcgcc gggagatccc cgcgatcctg gcagaccgta gccccgttct 2940  
 cgtccgtgac cttctgtggc ctctcctcct cactggaggt tgcgggaggc aggcagacac 3000  
 ccacgaaggg agaggggagc ccggcatcct cggggacccg ggaaccggag ccgagagagg 3060  
 tggccgcgag gaaagcggtc cccagccgc gaagcgagga gggcgatgtt caggctgcag 3120  
 ggcaggccgg gtgggagcag cagccaccac cggaggaccg gaacagtgtg gcggcgatgc 3180  
 agtctgagcc tgggagcgag gagccatgtc ctgccgcaga gatggctcag gaccccggtg 3240  
 attcggatgc cctcggagac caggcctccc cgcaaagcac gggagaggac aaggagcgcc 3300  
 tgcgtttcca ggtgaggcca gcctgatggc ctggacgctt ccagaattgt agggctcctt 3360  
 cagggtctaa ctggtggctc tgggtgatgc agaacataga attcttccat gccatccgtc 3420  
 tggtttttgt tgtttgtttt ttgttaacat gtttggtgtt ttgattgcat gttgtatctg 3480  
 tacaattcgt ttagtgagag agatgggagc agaagagggc gtccgatccg gatccctgg 3540  
 gaatggcgct ttacagatgg ttgtgagtca ccattgtagt tttaggatcg gaattacggt 3600  
 cctctagaag aacagggtgt tgtttcacag ctgagccatc tctccagctc ttggcatat 3660  
 aggattttgc agccgctgac tgttaataca atgggaggcg ttacacaaat aaaaaccac 3720  
 ccattatgtt cctgaccac tggcagcctc tgcctcctgg gaatgccagt tgttaattatt 3780  
 ctgatcacat aaacgctaca catgaggctt ccggcgagaa tgcgcacagt ctgggttttg 3840  
 accaaacttc agatggctga aggaagataa gtgcacacat ggcagaaaca taattctttg 3900  
 aacttcgttg cggggagagt cggtttccca aggcctcctt ttttatttcc cctctagatg 3960  
 atctgtcttg gttacttgc cggcttgttc tataccagcc ccttccttcc gttctgaag 4020  
 ctgtcaactg aagcttctct ctcccaact tgcctggctt aaaaaacaaa caaacaaaa 4080  
 caaaacccc ccccaaaaa aaaaaaac aaaaaaaa aagaaaagaa aagaaaaag 4140  
 aaataaaga aaaaaaaac cactctcccc attcatcgag gccagccact gctaagctgt 4200  
 tggatggtct tgaattgctg cctgtgctag caaacaagga ggcacaaga gtgctgtagg 4260  
 tegtataccc ccaccaaaga aatggagagc cctgagctcc aggagaggac tctgagacat 4320  
 tccttgtttt tcagtcattt caaggctggt gtgtttgagg ttgggggtggc agtggaatgg 4380  
 ggtgtcagaa aaaatagaaa agtgcttggc ggttgctgtt cacagctggg tbtgatctct 4440  
 taggcagaaa tcccaagttt tcgggcctct gtggtgtctg ttccactata aaaaattgca 4500  
 ttaagagttc ttccaagccc tgccactcct aaagacttag ttataaaaa ttgtttccaa 4560  
 cttgtttgtc actaagtggt aagcttggga agtttaagaa ccagggtgcta acactatgta 4620  
 gttcatacca aatgagctag acttgggtag gtacggggac tcttttggaa acttacctag 4680

WO 02/088314

PCT/US02/13245

```

catcaaggaa aatttagtat tggttgaaga ctttcaaag ttttagaaga gcctttctct 4740
ttcggcataa caactttccc atgtgtgagt gtactaatgc atgcgccaca taaaatgcca 4800
cgggaagaat cccaaactct aaaccgcacg atttggcttc tcccttgtct gaggggggaa 4860
aaaccaetta tcggtctgct gctatatgaa ctatcttggt tggcctccgt ttacatattt 4920
gtttgattga gctattagtt caccgtggtt acttagaggt tgacccaagt ctaaccttac 4980
taccacggta atcttaaagt atcaagtgga atgtggtccc aggttctgaa aattagggtc 5040
actcgggat cacttgctta aagtctggtt cctgctggt cagttcttag agcagaagta 5100
cggctactat cactgcaagg actgcaaat ccggtgggag agcgcctatg tgtggtgtgt 5160
gcagggcacc agtaaggtaa gagacacgt gcagccctcc tgcctctgct tgttgccgag 5220
tgtctgctcc atgccgatgt ctttctcttc gcaggtgtac ttcaaacagt tctgccagat 5280
gtgtgagaaa tctacaaccc ctacagaggt ggaggacatc acctgtcaa taaaccaaac 5340
gtttgcattt tggaagaggg gtttgggtga cgaacttgag tatatttct gaaggaggtg 5400
gtttccagta gcttaggct ctactcttcc cctcctcctt cctttctatt ttgactagg 5460
ttggtggtag aaagtccctt ccaactgtaa tgggtgtttt actccctctc gctgtgttaa 5520
aacttgattg catgccctct cttgcatctg gttacottgt tagcagtaga aagggtttgc 5580
ttactgggtt tcttccactt cggacctaag ggaaaacata ttgcaaaaca gagtgccttt 5640
ctgtagctt gagatggtag acattacccc aatgctacat aggaaacaca ttcccaagtt 5700
agcatatgaa acacaagaaa ttgagctctg gcttttctt agagtttaca aagggtgttt 5760
cctgtaagac catcctacac tgtctagctc tatgcagttt acccataact gtggctaaga 5820
gtttgtcttc ttagtattaa tttagcactg tgccaaggga cttagataac cttgaaaaca 5880
tttacctgtt aaaattaatg acagagataa aggaattcga attccacatc tgagagccca 5940
gtgcacttaa agttggtaat tggagaatta attaccttag ggtgggcoct gtgaaacoga 6000
gaatggaaag ccactaaaga ctccatctag aaaaggggac tgtagtcaat tttctacaat 6060
aaggggcctt aaacttccct aagcttccct gcacttggtt ctcagtgccc agcacacag 6120
ccactgttc tgtaactctg tttgaagctc caagaatcga gtggagacag ggtcacccct 6180
ttgtactttt cactccgatt tttcagaagt tgtaaaagaa ctaagatgtg cctgccagtt 6240
cagactctgc cacttggaac ctaaaagccc ccactggcaa gacttgtgtg ggagatgcaa 6300
ggacaaaagc ctgtcctgag acagcacctt cagcttcaaa tacatcattt agtgagagtc 6360
gaaaacgttt ctgctagatg gggctaattg aatggacaag tgagctttct cccctcttca 6420
cctcttccct ttccaaattc ttcatgacag acagtgtact tggatataaa gctgtgtaat 6480
aaaaggtatt gcaaaccaag ttgaggcttt atccaattca tgtgtcagtt tgaggggtgc 6540

```

WO 02/088314

PCT/US02/13245

atgtgctggag agtcaataac ttctttaaca ttgtttgatg agagtgaatc aggtctgactt 6600  
 aaggaagtta aaggcacctc attcaacaat taagattttt ctttcttttt gtttagtttt 6660  
 attttatita taaatataatg agtacactgt agctgtcttc agacacacca aaagaaggca 6720  
 tcagatccca ttacagatag ttgtgagcca ccatgtggtt gctgggactt gaactccgga 6780  
 cctctggaag agcagtttgt aaaccccttt ctttaactgt gaaccatctc tccagcccaa 6840  
 atcttaaggt ttacagaca agaattattac agg 6873

<210> 12  
 <211> 4090  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(4090)  
 <223> N equals unknown

<400> 12  
 ggccggcgag ggcggggag caccatgtt cccggcgag acgttcacc cctgcccgca 60  
 tccttatccg caggccacca aagccgggga tggctggagg ttccgagcca ggggctccg 120  
 acccgcgccc cctccttcc tcccggcta cagaagctc atggccgagg agtaactga 180  
 cagccaccag cgggcacagc tcattggcct gotgtcgagg atgggtccc ggtcggtcag 240  
 cagccgtgac gctgcgggtc aggtgaacc ggcgcggag gccctgggtc agtgttcaact 300  
 cgggcgccgc acgtctgagc ctgcagggtg ccgagccagc ccgacgccc ggtcgggttc 360  
 ctgtcaacc cgtggccacg ccggcgccgg gagatccccc cgatcctggc agaccgtagc 420  
 cccttctcgc tccgtgacct tctgtggcct ctcctcctca ctggagggtt cgggaggcag 480  
 gcagacccc acgaaggagg aggggagccc ggcattcctc gggacccggg aaccggagcc 540  
 gagagagggt gccgtgagga aagcgggtccc ccagccgga agcgaggagg ggcacgttca 600  
 ggctgcaggg caggccgggt gggagcagca gccaccacc gaggaccgga acagtgtgga 660  
 ggcgatgcag tctgagcctg ggagcgagga gccatgtcct gcgcagaga tggctcagga 720  
 ccccggtgat tcggatgcc ctcgccgcaa agcaccagc aggacaagga gctcctgcgt 780  
 ttccaggtga ggcagcctg gnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 840  
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 900  
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 960  
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 1020  
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 1080

**PCT/US02/13245**

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)



WO 02/088314

PCT/US02/13245

gtcacccgtgc aagtaaaccga aacgcttctnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn 2940  
 nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn 3000  
 nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn 3060  
 nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn 3120  
 nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn 3180  
 nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn 3240  
 nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn 3300  
 nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn 3360  
 nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn 3420  
 nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn 3480  
 nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn 3540  
 nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn 3600  
 nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn 3660  
 nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn 3720  
 nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnn 3780  
 nnnnnngctct gagttttcag agttgtaaag gaactagatg tgccctgccca gtcagacctc 3840  
 gccacgtgta ccttagacgc ccccatcagc aagacttggt tgagagatgc aaggacaaac 3900  
 gccgtctctg cgacagcaacc gtcagcttca aatacatgat ttagtgagag tcgaaaaacgt 3960  
 ttctgctaga tggggctaata ggaatggaca agtgagcttt ctccctcttt caccctcttc 4020  
 cttcccaaat tcttcatgac agacagtggt acttgatat aaagcctgtg aataaaaggt 4080  
 attgcaaaaca 4090

<210> 13  
 <211> 2075  
 <212> DNA  
 <213> human

<400> 13  
 gttaaattga catabcctgt tgttcagttc ttagagcaga aatatggcta ttaccactgc 60  
 aaggactgca acatccgctg ggagagtgct tatgtgtggt gtgtacaggg aactaacaag 120  
 gtaagaata ccaggtaact ggcattctct tgctgaaagt gtcaaggcga ttttaagttt 180  
 atcctctttg tcatcacagg tttaacttcaa acagtttttc agaacttgtc agaagttcta 240  
 taacccttac cgagtggagg atatcacctg tcaagtaaata cagatgtttt gcattttgtc 300  
 tgacctgggc agtcgtcgag ggtttttagt atagtttgag tatacttcca aaaagaggcc 360

WO 02/088314

PCT/US02/13245

```

agggcccccag accttagggt tcaactggct ttgttagga gtggtagaaa caatactcag 420
ctgggaacg gggcctgggt gttagctctt ttctggcctt gcaaatcttg ctgttggttaa 480
cctcttctaa aactgttaac ctcaacttga atatggaaga atacttgctt tacttgctac 540
ttagtctaata gtataagaaa atcaacaaaa acatgcttgt cagctaacat gaggtagtca 600
aggttgactg ttttaccgaa acgcttctta tgaagcaca ccttaaagta cttaaagaca 660
gggggttagt ttgtcttgcc tgaagctca caaagggaca gtttaagata aatctaagtt 720
gtctagcttt atggggaggt gactataatg gtaagcaagc aatatgttaa ctaagcatbg 780
cttaagcgct tgcttgctat taactgtgct aaggggotta gctaactctt aagaggaaag 840
aagtgaactc attgcctcc tgccacacag ctaatggagt ctgaattgcc agttgagaca 900
gcctaactca tacacttgac ccaagtggga tatitaaaag cattaacacc ctggggtggt 960
ggagagaac taagtatgga aagccactta gaatcactta gatcagagct gggcatgttt 1020
ctaaaaggag atgccttaac cactctgctc ttggtgttca ttgtcaaatt catccctgac 1080
ttgtctctca cctttctct taaacagttg ttgtaaaaga aatttcocaa ttcataatbg 1140
gatctgacg aatatagcag cagtacagca tggtaaaaca cccactatc ctagccctgt 1200
cattgtcag taggtaggga tgtagaggga aaacaagatt actatgggac ctgtcttga 1260
gcacattcat taagtacttg aatggactag aaaaatgttg aagtcctagg aaatcactaa 1320
gggtttatct tctgcatgcc cttctgtatt tttttccccc agagtgttaa acaaacgaga 1380
tgttctgctc cagtaaaact tcgccacgtg gacctaaac ggcccccacg tcaagatttg 1440
tgccgtagat gcaaaaggcaa acgcctgtcc tgtgacagca ctttcagctt caaatacatc 1500
atttaggtga aagtcagtgt tgcgtgcat gcgctgatg agtagacgag tgagcttttc 1560
cgtgcctctc ctccacctct cctttctcaa aatacttcat gaaaggcagt gtattctgaa 1620
aaagccttca aataaaggta ttgcaacag attatatacat tgcataaaat ctgtctttga 1680
aaataaagtt tcaagagcgc ttgtcttggt ctaacagctt gggcctgtca cttcaccttt 1740
atgaatgctt gctgatggca tagagtgggc caggctctga gttaggctgc agccacttg 1800
aaaaaattt aggggggtgc ttgtagacga ggtctactta tttaggcagg totggaggac 1860
tgaagcttag aaggaaagta actgaataaa aagccgccta gcgacgogc cactgcactc 1920
cagcctgggt gacagagtga gactccatct caaaaaaaaa agctgcctag ctgtaacatt 1980
aaggcattct ttgggagag gtggaggcag agccatttat tggttgcatg agacggttg 2040
aggttaacgt tagtaagaa tgctgagtg cggtg 2075

```

<210> 14  
 <211> 1118

WO 02/088314

PCT/US02/13245

<212> DNA  
<213> human

<400> 14  
ggggggagct gggacctaag cggcgcgac acccctttct ctgcgtctgg tggagggtga 60  
cagaggcttt tgaatcagc ccaagcgag ccaggtgacc tccccgggc ctttcaagcc 120  
tgagctcggg ggaacagctc ctctcccggt agtcccgctg tctgtacgc gcccggtcga 180  
gccccgggct ggcaccccg ctaggagctg cccggccagc ccgcttctct gcccgagacc 240  
atgaatctca gtagcgccag tagcacggag gaaaaggcag tgacgacgt gctctggggc 300  
tgagagctca gtcaggagag gcggaattgg accttcagac ccagctgga ggggaagcag 360  
agctgcagcg tgttgcttca tacgatttgc ttgggggaga aagccaaaga ggagatgcac 420  
cggtggaga tctgtcccc agcaaacagc gaggacaaga agatgcagcc ggtcaccatt 480  
gctcactcc aggcctcagt cctccccatg gtctccatgg taggagtga gctttctccc 540  
ccagttactt tccagctccg ggtgggtcca ggaccggtgt tctcagtgga ccaggaaagt 600  
tatgaagcat cagacctaac ctgggaggag gaggaggaag aagaagggga ggaggagga 660  
gaggagagg aagatgatga ggatgaggat gcagatatat ctctggagga gcaaacccct 720  
gtcaaacagc tcaaaaggct ggtgccccag aagcaggcga cggtggctaa gaaaaaaag 780  
ctggaaaaag aagaagagga aataagagcc agcgttagag acaagagccc tgtgaaaaag 840  
gccaaagcca cagccagagc caagaagcca ggattcaaga aatgaggagc cagcccttgg 900  
ggggcacggt gcaaaagtgg ccttccctgg gctgtgtgc aggcacaggg tgccctgtgc 960  
cagccccctc acctgtgtct gaatgcaaca ggggtgttgc gggggcaaca tgagagcccc 1020  
tcacccccaa ctctccactt tcaggaggcc ccagtggaag agccccacct cgggggtcaca 1080  
ataaagttgc ctggtcagga aaaaaaaaa aaaaaaaa 1118

<210> 15  
<211> 200  
<212> PRT  
<213> xenopus laevis

<400> 15

Met Ala Ser Thr Val Ser Asn Thr Ser Lys Leu Glu Lys Pro Val Ser  
1 5 10 15

Leu Ile Trp Gly Cys Glu Leu Asn Glu Gln Asp Lys Thr Phe Glu Phe  
20 25 30

Lys Val Glu Asp Asp Glu Glu Lys Cys Glu His Gln Leu Ala Leu Arg  
35 40 45

WO 02/088314

PCT/US02/13245

Thr Val Cys Leu Gly Asp Lys Ala Lys Asp Glu Phe Asn Ile Val Glu  
 50 55 60  
 Ile Val Thr Gln Glu Glu Gly Ala Glu Lys Ser Val Pro Ile Ala Thr  
 65 70 75 80  
 Leu Lys Pro Ser Ile Leu Pro Met Ala Thr Met Val Gly Ile Glu Leu  
 85 90 95  
 Thr Pro Pro Val Thr Phe Arg Leu Lys Ala Gly Ser Gly Pro Leu Tyr  
 100 105 110  
 Ile Ser Gly Gln His Val Ala Met Glu Glu Asp Tyr Ser Trp Ala Glu  
 115 120 125  
 Glu Glu Asp Glu Gly Glu Ala Glu Gly Glu Glu Glu Glu Glu  
 130 135 140  
 Glu Asp Gln Glu Ser Pro Pro Lys Ala Val Lys Arg Pro Ala Ala Thr  
 145 150 155 160  
 Lys Lys Ala Gly Gln Ala Lys Lys Lys Lys Leu Asp Lys Glu Asp Glu  
 165 170 175  
 Ser Ser Glu Glu Asp Ser Pro Thr Lys Lys Gly Lys Ala Gly Arg  
 180 185 190  
 Gly Arg Lys Pro Ala Ala Lys Lys  
 195 200  
 <210> 16  
 <211> 103  
 <212> PRT  
 <213> human  
 <400> 16  
 Phe Leu Glu Gln Lys Tyr Gly Tyr Tyr His Cys Lys Asp Cys Asn Ile  
 1 5 10 15  
 Arg Trp Glu Ser Ala Tyr Val Trp Cys Val Gln Gly Thr Asn Lys Val  
 20 25 30  
 Tyr Phe Lys Gln Phe Cys Arg Thr Cys Gln Lys Ser Tyr Asn Pro Tyr  
 35 40 45  
 Arg Val Glu Asp Ile Thr Cys Gln Ser Cys Lys Gln Thr Arg Cys Ser

WO 02/088314

PCT/US02/13245

50 55 60  
Cys Pro Val Lys Leu Arg His Val Asp Pro Lys Arg Pro His Arg Gln  
65 70 75 80  
Asp Leu Cys Gly Arg Cys Lys Gly Lys Arg Leu Ser Cys Asp Ser Thr  
85 90 95  
Phe Ser Phe Lys Tyr Ile Ile  
100

<210> 17  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Mus musculus

<400> 17  
gcaaagaagc cagtgaacaa gaaatga 27

<210> 18  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Mus musculus

<400> 18  
cctgatcatg caaatatttat tgtggcc 27

<210> 19  
<211> 18  
<212> FRT  
<213> Mus musculus

<400> 19  
Lys Arg Pro His Arg Gln Asp Leu Cys Gly Arg Cys Lys Asp Lys Arg  
1 5 10 15

Leu Ser

<210> 20  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Mus musculus

<400> 20  
ctagaaaagg ggactgtagt cact 24

<210> 21  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Mus musculus

WO 02/088314

PCT/US02/13245

<400> 21  
tgcattctcc acacaagtct tgcc

24

<210> 22  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Mus musculus

<400> 22  
ctagaaaagg ggactatagg cacc

24

<210> 23  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Mus musculus

<400> 23  
tgcattctct acacaagtgt tgct

24

## 【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
7 November 2002 (07.11.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
**WO 02/088314 A3**

(51) International Patent Classification: C07H 21/04, C12Q 1/68 (74) Agent: ACOSTA, Melissa, W.; Fulbright &amp; Jaworski, L.L.P., 1501 McKinney, Suite 5100, Houston, TX 77010-3095 (US).

(21) International Application Number: PCT/US02/13245

(22) International Filing Date: 26 April 2002 (26.04.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 09/844,864 27 April 2001 (27.04.2001) US

(71) Applicants (for all designated States except US): BAYLOR COLLEGE OF MEDICINE [US/US]; Associate General Counsel, One Baylor Plaza, Suite 106A, Houston, TX 77030 (US). WYETH [US/US]; Five Giraldi Farms, Madison, NJ 07940 (US).

(81) Designated States (national): AI, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GR, GU, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CH, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:  
with international search report(72) Inventors; and  
(75) Inventors/Applicants (for US only): MATZUK, Martin, M. [US/US]; 2926 Russett Place West, Pearland, TX 77584 (US). WANG, Pei [CN/US]; 5319 Austin Avenue, Houston, TX 77004 (US). BAI, Yuchen [CN/US]; Wyeth, 500 Arcola Road, Rm. S2316, Collegeville, PA 19426 (US). WU, Xuemei [CN/US]; Apt. 1038, 4010 Linkwood Drive, Houston, TX 77025 (US).(88) Date of publication of the international search report:  
12 September 2003

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/088314 A3

(54) Title: OVARY-SPECIFIC GENES AND PROTEINS

(57) Abstract: The present invention relates generally to ovary-specific genes (O1-180, O1-184 and O1-236) and the proteins they encode. Also provided are methods for detecting cell proliferative or degenerative disorders in reproductive tissues. Yet further, the invention provides methods for screening of compounds that interact and/or modulate the expression or activity of the ovary-specific genes. These compounds are possible contraceptive agents and/or fertility agents.

## 【 国際調査報告 】

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No. PCT/US02/13245
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(7) : C07H 21/04; C12Q 1/68 US CL : 536/23.1, 536/24.3, 536/24.33, 536/24.32; 436/6 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 536/23.1, 536/24.3, 536/24.33, 536/24.32; 436/6  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) GENBANK, MEDLINE, CAPLUS,		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A, P	WO 00/24755 A1 (BAYLOR COLLEGE OF MEDICINE) 04 May 2000, see entire reference.	1-13, 18 and 19
A, P	SULTON et al. Toward A complete human genome sequence. Genome Research. 1998, Vol. 8, No. 11, page 1097-1108. see entire reference.	2
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 20 February 2003 (20.02.2003)		Date of mailing of the international search report 27 MAY 2003
Name and mailing address of the ISA/US Comptroller of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer Gary Ben Zion Telephone No. (703) 308 0196



INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/13245
<b>Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)</b>		
This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	<input type="checkbox"/>	Claim Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.	<input type="checkbox"/>	Claim Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.	<input checked="" type="checkbox"/>	Claim Nos.: 15-16, 38 and 39 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
<b>Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)</b>		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: Please See Continuation Sheet		
1.	<input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.	<input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	<input checked="" type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.: 1-13, 18, 19, SEQ ID NO: 11 and 13
4.	<input type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
<b>Remark on Protest</b>		<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/13245

**BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING**

Group I, claim(s) 1 and 3-13, drawn to an isolated polynucleotide (SEQ ID NO: 11)  
 Group II, claim(s) 2, drawn to an isolated polynucleotide (SEQ ID NO: 13)  
 Group III, claim(s) 14, drawn to a method of modulating contraception  
 Group IV, claim(s) 17, drawn to a method of enhancing fertility (using O1-180)  
 Group V, claim(s) 18, drawn to a method of screening for a modulator of O1-180 activity  
 Group VI, claim(s) 19, drawn to a method of identifying compounds that modulate the activity of O1-180  
 Group VII, claim(s) 20, and 21, drawn to a method of screening for a compound which modulate the activity of O1-180.  
 Group VIII, claim(s) 22, drawn to a method of identifying a compound that effects O1-180 activity  
 Group IX, claim(s) 23, drawn to a method of detecting a binding interaction of a first peptide (using O1-180).  
 Group X, claim(s) 24, drawn to a rescue screen for detecting the binding interaction of a first peptide (using O1-180)  
 Group XI, claim(s) 25, drawn to a method of identifying a binding partner for O1-180.  
 Group XII, claims 26-36, drawn to a pharmaceutical composition  
 Group XIII, claim(s) 37, drawn to a method of modulating contraception  
 Group XIV, claim(s) 40, drawn to a method of enhancing fertility (using O1-236)  
 Group XV, claim(s) 41, drawn to a method of screening for a modulator of O1-236 activity  
 Group XVI, claim(s) 42, drawn to a method of identifying compounds that modulate the activity of O1-236  
 Group XVII, claim(s) 43-44, drawn to a method of screening for a compound which modulate the activity of O1-236.  
 Group XVIII, claim(s) 45, drawn to a method of identifying a compound that effects O1-236 activity  
 Group XIX, claim(s) 46, drawn to a method of detecting a binding interaction of a first peptide (using O1-236).  
 Group XX, claim(s) 47, drawn to a rescue screen for detecting the binding interaction of a first peptide (using O1-236)  
 Group XXI, claim(s) 48, drawn to a method of identifying a binding partner for O1-236

The inventions listed as Groups I-XXI do not relate to a single inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: Under PCT Rule 13.1, applicant is entitled to the first product and method of making and using the same. Group I encompasses the first product and method of using the same, however, Groups II-XXI encompasses an alternate product and alternate methods of using the product. Further, the product of Group II is structurally and physically different from the product of Group I, therefore, lacks a special technical feature. Group III-XXI encompasses methods that use the product of Group I and the product of group II and as the two products are not linked by a special technical feature, neither are the methods as the first invention does not escape the prior art as the claimed sequence is taught by the UNIVERSITY OF EAST CAROLINA (WO 99913886, 25 March 1999).

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 15/16	A 6 1 P 15/18	
A 6 1 P 15/18	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	A 6 1 K 37/02	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN, TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE, GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,P L,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100105717

弁理士 尾崎 雄三

(74)代理人 100104101

弁理士 谷口 俊彦

(72)発明者 マザック、マーティン、エム.

アメリカ合衆国、テキサス州 77584、ピアランド、ラセット プレイス ウェスト 2926

(72)発明者 ワン、ペイ

アメリカ合衆国、テキサス州 77004、ヒューストン、オースティン アベニュー 5319

(72)発明者 バイ、ユーチェン

アメリカ合衆国、ペンシルヴェニア州 19426、カレッジビル、ルーム エス2316、アルコーラ ロード 500、ワイス

(72)発明者 ウー、シウメイ

アメリカ合衆国、テキサス州 77025、ヒューストン、リンクウッド ドライブ 4010、アパートメント 1038

Fターム(参考) 2G045 AA40 BB03 BB20 CB01 CB17 DA12 DA13 DA14 DA36 FB02  
FB03

4B024 AA01 AA11 AA12 BA80 CA01 CA09 DA02 DA05 EA04 GA11

HA11

4B063 QA19 QA20 QQ08 QQ20 QQ41 QQ52 QR32 QR33 QR74

4C084 AA02 AA13 AA17 BA01 BA22 BA23 CA53 NA14 ZA81 ZA86